

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 2 月 26 日 (26.02.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/016081 A1

(51) 国際特許分類: A01K 67/027,
C12N 15/13, C12P 21/02, C07K 16/00

野 健一郎 (ONO, Kenichiro) [JP/JP]; 〒396-0011 長野
県 伊那市 大字伊那部 2 7 4 9-1 メゾンなかみち
I-2 0 5 Nagano (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/010198

(22) 国際出願日: 2003 年 8 月 11 日 (11.08.2003)

(74) 代理人: 安富 康男, 外 (YASUTOMI, Yasuo et al.); 〒
532-0011 大阪府 大阪市 淀川区西中島 5 丁目 4 番
2 0 号 中央ビル Osaka (JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2002-236089 2002 年 8 月 13 日 (13.08.2002) JP

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 鐘淵化
学工業株式会社 (KANEKA CORPORATION) [JP/JP];
〒530-8288 大阪府 大阪市 北区中之島 3 丁目 2 番
4 号 Osaka (JP). 財団法人名古屋産業科学研究所
(NAGOYA INDUSTRIAL SCIENCE RESEARCH IN-
STITUTE) [JP/JP]; 〒460-0008 愛知県 名古屋市 中区
栄 2 丁目 1 0 番 1 9 号 Aichi (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許
(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 飯島 信司
(IJIMA, Shinji) [JP/JP]; 〒468-0022 愛知県 名古屋
市 天白区高島 2 丁目 7 0 6 Aichi (JP). 上平 正道
(KAMIHIRA, Masamichi) [JP/JP]; 〒464-0846 愛知県
名古屋市 千種区城木町 2 丁目 7 1 宝マンション城木
町 6 0 3 Aichi (JP). 西島 謙一 (NISHIJIMA, Kenichi)
[JP/JP]; 〒464-0804 愛知県 名古屋市 千種区東山元町
5 丁目 4 9-1 葛岡マンション 3 0 2 Aichi (JP). 小

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: METHOD OF EXPRESSING GENE IN TRANSGENIC BIRDS USING RETROVIRUS VECTOR AND TRANS-
GENIC BIRDS THUS OBTAINED

(54) 発明の名称: レトロウイルスベクターによる遺伝子導入鳥類での遺伝子発現法およびそれによって得られる遺
伝子導入鳥類

(57) Abstract: It is intended to provide G0 transgenic chimeric birds which have an antibody gene having been transferred thereinto
by using a retrovirus vector with a lack of replicability and produce the antibody by expressing the transferred gene; a process for
producing an antibody by collecting the antibody expressed by the constructed G0 transgenic chimeric birds; and a method of con-
structing G0 transgenic birds by incubating fertilized bird eggs and injecting a retrovirus vector into these fertilized eggs excluding
immediately after the initiation of the incubation. Namely, G0 transgenic chimeric birds having an antibody gene transferred there-
into by using a retrovirus vector with a lack of replicability and producing the antibody by expressing the thus transferred gene.

(57) 要約: 本発明の目的は、複製能欠失型レトロウイルスベクターによって抗体遺伝子が導入され、導入遺伝子
を発現することにより抗体を産生する G0 トランスジェニックキメラ鳥類、及び作製した G0 トランスジェニック
キメラ鳥類が発現する抗体を回収することよりなる抗体生産法、及び鳥類受精卵を孵卵し、孵卵開始直後を除くそ
れ以降の受精卵にレトロウイルスベクターをインジェクションすることよりなる G0 トランスジェニックキメラ鳥
類の作製法を提供することである。即ち、本発明は、複製能欠失型レトロウイルスベクターによって抗体遺伝子
が導入され、導入遺伝子が発現することにより抗体を産生する G0 トランスジェニックキメラ鳥類である。

WO 2004/016081 A1

明細書

レトロウイルスベクターによる遺伝子導入鳥類での遺伝子発現法およびそれによって得られる遺伝子導入鳥類

5 技術分野

本発明は、血液中ならびに卵中に、抗体、例えば s c F v - F c 抗体を産生する G O トランスジェニックキメラ鳥類に関する。また本発明は、複製能欠失型レトロウイルスベクターによって外来性抗体遺伝子が導入された G O トランスジェニックキメラ鳥類を作製し、血中、卵白中あるいは卵黄中に産生した抗体を回収

10 することからなる抗体産生法に関する。更に本発明は、効率的に導入遺伝子を発現する G O トランスジェニックキメラ鳥類の作製法ならびに該作製法より得られる G O トランスジェニックキメラ鳥類に関する。

背景技術

- 15 遺伝子機能の研究手段として、外来遺伝子を宿主に組み込んだ遺伝子導入（トランスジェニック）動物の研究が盛んに行われているが、このトランスジェニック動物は、基礎研究だけでなく、品種改良や物質生産、移植用臓器のドナー等、産業応用にも有効である。ウシ、ヤギ、ヒツジ等の乳汁に生理活性物質を産生させる試みが実用に近づいており、その代表例として α 1 - アンチトリプシンやア
- 20 ンチスロンビン、医薬品への応用を目的として現在臨床段階にある。

- ウズラやニワトリに代表される家禽鳥類は、食肉用、採卵用家畜としての飼育実績が長く、トランスジェニック研究の目的としても耐病性や肉質向上等、品種改良に係るさまざまなアプローチが考えられる。また、鳥類は性成熟までの期間が短く、小さなスペースで飼育可能なことから、安価なコストで実施可能なタン
- 25 パク質発現系と考えられ、抗体医薬品や希少タンパク質の産生手段としてのトランスジェニック作製に期待が持たれている。鳥類の卵は多量のタンパク質を含有し、毎日連続的に生産されることから、導入遺伝子産物を組換えタンパク質として意図的に卵中に産生させることができれば、効率的な生産システムとなると考えられる。

近年数多くの品目が上市され、医薬品として注目されているモノクローナル抗体は、大腸菌などによる安価な発現システムでは生産できず、単価が高いことが普及の妨げとなっている。鳥類細胞は抗体タンパク質を構成する機能を備えており、トランスジェニック鳥類は、従来大量生産が困難であった医療用抗体等の生産手段として期待できる。更にこれらのタンパク質生産物には、鳥類細胞によって糖鎖が付与されることにより血中での安定性が向上する等、医薬、検査薬としての応用上有利な性質を備える可能性が高いと考えられる。

このように、有用タンパク質の生産手段としての応用が待たれるトランスジェニック鳥類であるが、一方で現在までに様々な試みがあるにも係らず、鳥類の卵に10 実用レベルで目的とする組換えタンパク質を蓄積させた例はない。また、抗体のような複数のユニットからなる高次構造をもったタンパク質を、高濃度に発現するトランスジェニック鳥類を作製した例も、未だ報告されていない。

Harveyら (Harvey, A. Jら (2002) Nature Biotechnology, 19, 396) はエビアン・ロイコシス・ウイルス由来15 のベクターを用い、 β -ラクタマーゼ遺伝子をニワトリに導入し、G0トランスジェニックキメラニワトリを作製したが、血清あるいは卵への酵素発現量は50~250 ng/ml程度であった。このG0トランスジェニックキメラニワトリの交配により作製されたG1~G3トランスジェニックニワトリは、全身の体細胞に遺伝子が導入されることにより、酵素の発現量が増加したが、それでも数 μ g/ml20 のレベルに留まり、実用には遠い値であった。

一般的に遺伝子導入動物を作製するには、受精卵の前核へDNAをマイクロインジェクションする手法がとられるが、鳥類にはこの方法は応用できない。鳥類では1細胞期の胚を取得するのが困難なこと、また取得できたとしても、卵内の核を見分ける手法がないことがその理由である。1細胞期の胚を取得するには、25 雌性鳥類の輸卵管内から受精直後の卵を取得し、正常に発生させなければならぬ。近年Perryによって鶏の卵割前細胞を取得し、体外で培養するシステムが確立された (Perry, M. M (1988) Nature, 331) が、この手法によっても卵内の核を見分け、核内へ目的遺伝子を導入することは不可能である。

従って、鳥類受精卵への遺伝子導入は、細胞質へのDNA注入に限られ、DNA封入脂質二重膜（リポソーム）の利用やリン酸カルシウム法、電気導入法（エレクトロポレーション）の利用が試みられてきた。しかし、これらの手法では遺伝子の導入効率が悪く、また導入されたプラスミドDNAは、染色体に取り込まれる確率が低い。マイクロインジェクションによる遺伝子導入法は、効率的に目的DNAを受精卵に送り込むことができるが、導入されたプラスミドDNAは宿主染色体に組み込まれないため、宿主の体細胞分裂に伴って導入遺伝子プラスミドは脱落してしまい、安定な遺伝子導入効果は望めない。

1986年に初めてレトロウイルスベクターによるトランスジェニックニワトリの作製例が報告されている（Salter, D. Wら（1986）Poultry Sci., 65）。レトロウイルスベクターをマイクロインジェクション法で受精卵に注入する手法は、遺伝子の導入効率の高い手法であり、核内へ直接DNAを注入できない鳥類において、染色体へ目的遺伝子が挿入された安定なトランスジェニックを作製する唯一の実用的方法である。

本発明者らは鋭意研究を重ね、遺伝子治療にも応用されている安全な自己複製能欠失型ウイルスベクターを使用し、効率的に目的遺伝子を導入するトランスジェニック鳥類の作製法を見出した（特開2002-176880号公報）。これにより、安全かつ効率的に複数の導入遺伝子コピー数をもつトランスジェニック鳥類の作製が可能となった。またこの手法によれば、導入遺伝子は高い効率で次世代に伝達されることもわかり、物質生産システムとしての遺伝子導入鳥類の利用が実用に近づいた。

しかしながら、このとき導入された遺伝子の大部分は、発生初期に宿主によって不活性化されるため（遺伝子のサイレンシングと呼ばれる）、遺伝子発現の結果としてのタンパク質産生はごく微量であった。導入遺伝子が不活性化される生物学的メカニズムは未だ解明されていないが、この不活性化を回避し、目的遺伝子を効率的に発現させる技術が、トランスジェニック鳥類の応用開発に必須である。

レトロウイルスベクターによって受精卵に導入された遺伝子が、発生後どの時期に不活性化されるのかを特定するため、本発明者らは β -ガラクトシダーゼ発現遺伝子を指標とし、受精後の様々な時期にベクターを導入して発現量がどう変化するかを検討した。その結果、導入遺伝子の発現量は該遺伝子が胚発生のどの時期に導入されたかによって大きく変化してくることを発見し、本発明に至った。
すなわち、導入遺伝子の不活性化は、放卵直後に導入された遺伝子に対して顕著であり、放卵から一定時間経過後に導入された遺伝子は、発現頻度が高いというものである。

本発明者らはこの知見を利用し、鳥の種類によって決まる特定の時間が孵卵開始時より経過した後に、その初期胚へ外来遺伝子を導入すれば、宿主による不活性化の影響を受けず、目的遺伝子を効率的に発現させることが可能となることを見出した。

さらに、医薬品として有用なキメラ抗体、例えば s c F v - F c (1 本鎖抗体) をコードした遺伝子を組み込んだベクターを作り、この方法によりウズラに導入して、G 0 トランスジェニックキメラ鳥類を作製したところ、血中、卵白、卵黄中に導入遺伝子に由来する抗体が高濃度に発現することが見出された。

すなわち第一の本発明は、鳥類受精卵を孵卵し、放卵直後の胚盤葉期(ステージX)を除くそれ以降の初期胚へ複製能欠失型レトロウイルスベクターを感染させ、その胚を孵化させることからなるG 0 トランスジェニックキメラ鳥類の作製法、及び該方法により作製されたG 0 トランスジェニックキメラ鳥類に関し、第二の本発明は、複製能欠失型レトロウイルスベクターによって外来性抗体遺伝子が導入されたG 0 トランスジェニックキメラ鳥類であって、導入遺伝子に由来する抗体を血中、卵白中及び卵黄中の少なくとも1つに産生することを特徴とするG 0 トランスジェニックキメラ鳥類に関し、第三の本発明は、上記G 0 トランスジェニックキメラ鳥類を作製し、該G 0 トランスジェニックキメラ鳥類の血中及び/又は卵中から抗体を回収することよりなる抗体の生産法に関する。

本発明のG 0 トランスジェニックキメラ鳥類による導入遺伝子の発現は、誕生したG 0 トランスジェニックキメラ鳥類が成鳥になっても維持されることが確認された。したがって、本発明により特定の遺伝子を鳥類に導入し、目的タンパク

質を成長後も産生する、実用的な生産システムを構築することができる。また、本発明によって作製されたG O トランスジェニックキメラ鳥類の導入遺伝子は、交配により高い伝播効率で次世代に受け継がれる。導入遺伝子は、染色体に組み込まれたかたちで次世代に受け継がれるため、このトランスジェニック鳥類による生産システムは、安定的な物質生産が可能である。

本発明により、トランスジェニック鳥類がその体細胞中に産生させた目的タンパク質は、血液中に分泌され、血清から分離することで利用可能となる。

更に本発明者らは、ヒト I g G クラスの定常領域をもつ抗体や、ウズラ I g G、ニワトリ I g G 又はマウス I g G の定常領域をもつ抗体が、ウズラ、ニワトリにおいて血中から卵中に効率的に移行することを見出した。これらの定常領域をもつ抗体を本発明の方法により作製されたG O トランスジェニックキメラ鳥類に発現させた場合、血中に分泌された抗体が卵中に高濃度に蓄積される。

トランスジェニック動物に遺伝子を導入して目的タンパク質を取得する場合、哺乳類では乳汁中に分泌させて回収するのが一般的だが、鳥類のトランスジェニックでは卵に目的物を蓄積させ、その卵白、卵黄から回収、精製するのが実際的である。

鶏卵などでは全成分の30%がタンパク質であり、その主成分となるタンパク質はオボアルブミンである。従来トランスジェニック鳥類の卵中に組換えタンパク質を発現させる方法として、このオボアルブミン等の発現プロモーターを利用し、その下流に目的タンパク質をコードする遺伝子を組み込んで、卵白中にオボアルブミンに代えて目的物を発現させるという考え方がとられていた。

しかし、本発明の方法において、構成的なプロモーター、例えばニワトリ β -アクチンプロモーター等の制御のもとに、大量に発現した抗体、例えば前記 I g G クラス抗体等を血中に分泌させ、卵中に蓄積させることが可能となる。なお本明細書において、構成的なプロモーターとは、全身性に発現するプロモーターのことを意味する。

更に抗体の構造のなかで、卵中への移行に必須な部分を特定するため、抗体を F a b、F c フラグメントとしたものを、ウズラ、ニワトリ血中に接種して卵への移行性を調べた。その結果、卵内には F c フラグメントが蓄積され、抗体の卵

内への移行はF c レセプターを介して行われることが示唆された。

- このことからトランスジェニック鳥類による抗体の卵内での生産法を、タンパク質全般の生産に汎用化する方法として、ヒト Ig G の定常領域 (F c) が融合した構造をもつタンパク質を生産するベクターを設計し、トランスジェニック鳥類を作製して卵から目的物を含むタンパク質を回収し、F c 部を切断して目的物を精製する生産法が考えられる。

- また、従来哺乳類のトランスジェニック動物を使って抗体を生産した場合、産生動物がもつ自己抗体と目的抗体を分離精製するのが困難との問題が指摘されていた。産生動物に鳥類を使う抗体生産法の利点として、鳥類の自己抗体がプロテインA、プロテインGカラムに吸着されないため、目的とする組換え抗体との分離が容易な点も挙げられる。

前述のように、ヒトモノクローナル抗体は、医薬品として有用であるにも係らず、その生産には動物細胞培養やマウス腹水といった高価な生産手段しかなく、単価が高いことが普及に際して妨げとなっている。

- 近年遺伝子工学的手法を用いて、抗体のH鎖、L鎖のV領域のみをリンカー配列でつなげた s c F v (1本鎖抗体) が作製されているが、これは大腸菌でも生産されるという利点があり、コストの点から注目されている。しかし、低分子抗体と呼ばれるこれらのタンパク質は、血中での安定性が低いため、治療用、試験用としての実用性に難があった。

- s c F v に F c 領域をつなげた s c F v - F c は、血中でも安定であり、より実用的と考えられるが、大腸菌では生産できず、動物細胞を使ったバイオリアクターでしか供給できない。ニワトリなど他の動物に作らせた結合領域をもつ s c F v にヒトの F c を結合させたヒト化 s c F v - F c は治療用としても有望であり、このタンパク質を本発明による G 0 トランスジェニックキメラ鳥類により大量に生産できれば、その有用性は大きい。

本発明の G 0 トランスジェニックキメラ鳥類は、s c F v - F c のような組換え抗体、キメラ抗体、ヒトモノクローナル抗体など、従来の方法では少量しか生産できなかった抗体タンパク質を安価に大量に生産し、実用的に回収、精製して利用することに応用できる。

このように本発明ではレトロウイルスベクターによるG Oトランスジェニックキメラ鳥類において、導入遺伝子を効率的に発現させる作製法を開示する。また本発明では、特定遺伝子を導入することにより、鳥類体細胞に有用な目的タンパクを産生させるG Oトランスジェニックキメラ鳥類の作製法を開示する。更に従
5 来大腸菌等で産生することが不可能だったモノクローナルヒト型抗体や、キメラ抗体、s c F v - F c抗体、複雑な高次構造をもった機能性タンパク等、医薬、検査薬として有用な物質を鳥類細胞に産生させ、血清や卵中から回収して利用する、生産コストの低いタンパク生産システムを開示する。

また本発明のG Oトランスジェニックキメラ鳥類の作製法を応用して、家禽鳥
10 類を好ましい方向へ改質する手法および改質された鳥類を提供することも考えられる。家禽鳥類の好ましい性質としては、肉質改善、耐病性の向上、生育速度の向上等が挙げられる。鳥類はまた愛玩用途としても多種の需要をもっているが、本発明の作製法は、羽毛色の改善、攻撃性の低下等、愛玩用として好ましい形質へ短期間で品種改良するための手段としても応用しうる。

15 更に、現在哺乳類、両生類、魚類等のトランスジェニック作製は、核移植によって行われるのが通常であるが、本発明はそれに代わる新たなトランスジェニック動物作製の効率的手法としても応用できる。

即ち、本発明は、複製能欠失型レトロウイルスベクターによって外来性抗体遺伝子が導入されたG Oトランスジェニックキメラ鳥類であって、導入遺伝子に由来する抗体を、血中、卵白中及び卵黄中の少なくとも1つに産生するG Oトランスジェニックキメラ鳥類である。上記抗体の定常領域は、クラスがヒトI g Gであるか、サブクラスがヒトI g G 1であるか、ウズラI g G、ニワトリI g G、あるいはマウスI g Gであることが好ましい。上記抗体遺伝子は、構成的なプロモーターにより制御されていることが好ましく、上記構成的なプロモーターは、
25 ニワトリ β -アクチンプロモーターであることが好ましい。上記レトロウイルスベクターは、モロニー・ミューリン・ロイケミア・ウイルス由来ベクターであることが好ましく、V S V - G シュードタイプであることが好ましい。本発明のG Oトランスジェニックキメラ鳥類は、ニワトリあるいはウズラであることが好ましい。上記抗体は、キメラ抗体であることが好ましく、上記キメラ抗体の産生量

は、血液中には、 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上であることが好ましく、より好ましくは $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上であり、卵白中には、 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上であることが好ましく、より好ましくは $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上であり、卵黄中には、 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上であることが好ましく、より好ましくは $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上である。また、上記抗体は、 scFv-Fc 抗体であることが好ましく、上記 scFv-Fc 抗体の産生量は、血液中には、 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上であることが好ましく、より好ましくは $2000 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上であり、卵白中には、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上であることが好ましく、より好ましくは $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上であり、卵黄中には、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上であることが好ましく、より好ましくは $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上である。本発明のG0トランスジェニックキメラ鳥類を作製し、上記G0トランスジェニックキメラ鳥類の血中及び／又は卵中から抗体を回収する抗体の生産法もまた、本発明の1つである。

鳥類受精卵を孵卵し、放卵直後の胚盤葉期を除くそれ以降の初期胚へ複製能欠失型レトロウイルスベクターを感染させ、その胚を孵化させることからなるG0トランスジェニックキメラ鳥類の作製法もまた、本発明の1つである。本発明のG0トランスジェニックキメラ鳥類の作製法において、複製能欠失型レトロウイルスベクターを感染させる時期は、孵卵開始から24時間以降であることが好ましい。上記複製能欠失型レトロウイルスベクターを感染させる方法は、初期胚に形成される心臓ないしは血管内へマイクロインジェクションすることであるのが好ましい。上記心臓ないしは血管は、孵卵開始から24時間以降の初期胚に形成されるものであることが好ましい。マイクロインジェクションする複製能欠失型レトロウイルスベクターの活性は、 $1 \times 10^7 \text{cfu}/\text{ml}$ 以上のタイターであることが好ましく、 $1 \times 10^8 \text{cfu}/\text{ml}$ 以上のタイターであることがより好ましく、 $1 \times 10^9 \text{cfu}/\text{ml}$ 以上のタイターであることが更に好ましい。上記レトロウイルスベクターは、モロニー・ミューリン・ロイケミア・ウイルス由来ベクターであることが好ましく、VSV-Gシュードタイプであることが好ましい。本発明で作製するG0トランスジェニックキメラ鳥類は、ニワトリまたはウズラであることが好ましい。上記複製能欠失型レトロウイルスベクターに組み込まれる導入遺伝子は、レトロウイルスに由来しない遺伝子配列を含有すること

が好ましい。上記レトロウイルスに由来しない遺伝子配列は、ニワトリ β -アクチンプロモーターにより制御されている遺伝子配列であることが好ましく、抗体遺伝子又は融合タンパク遺伝子をコードする遺伝子配列であることが好ましい。

- 上記抗体遺伝子は、キメラ抗体遺伝子であることが好ましく、s c F v-F c 抗体遺伝子であることが好ましい。

本発明のG 0トランスジェニックキメラ鳥類の作製法で作製されたG 0トランスジェニックキメラ鳥類もまた、本発明の1つである。

図面の簡単な説明

- 10 図1は、複製能欠失型レトロウイルスベクターのベクターコンストラクトpM S C V N Δ A β の構造を示す。N e o^rはネオマイシン耐性遺伝子を、A m p^rはアンピシリン耐性遺伝子を示す。P _{Δ A c t}は β -アクチンプロモーター遺伝子を示す。 β -G a lは β -ガラクトシダーゼ発現遺伝子を示す。 Ψ +はパッケージングシグナル配列を示す。5' L T R及び3' L T RはそれぞれM o M L Vの
- 15 ロングターミナルリピート配列を示す。

図2は、G 0トランスジェニックキメラウズラにおける、遺伝子の導入時期と β -ガラクトシダーゼ活性発現との関係を示す。横軸は孵卵時間 (h r) を、縦軸はm U n i t / m g で表される β -ガラクトシダーゼ活性を示す。

- 図3は、G 0トランスジェニックキメラニワトリにおける、遺伝子の導入時期と β -ガラクトシダーゼ活性発現との関係を示す。横軸は孵卵時間 (h r) を、縦軸はm U n i t / m g で表される β -ガラクトシダーゼ活性を示す。
- 20

- 図4は、導入したレトロウイルスベクターのタイターとG 0トランスジェニックキメラウズラでの β -ガラクトシダーゼ活性発現との関係を示す。横軸はc f u / m l で表されるウイルスタイターを、縦軸はm U n i t / m g で表される β -ガラクトシダーゼ活性を示す。
- 25

図5は、導入したレトロウイルスベクターのタイターとG 0トランスジェニックキメラニワトリでの β -ガラクトシダーゼ活性発現との関係を示す。横軸はc f u / m l で表されるウイルスタイターを、縦軸はm U n i t / m g で表される β -ガラクトシダーゼ活性を示す。

図6は、ウズラ卵中に蓄積したヒトIgG抗体を示す。抗体値は3羽のウズラで行った同一の実験結果の平均値を示している。

図7は、ニワトリ卵中に蓄積したヒトIgG抗体を示す。抗体値は3羽のニワトリで行った同一の実験結果の平均値を示している。

5 図8は、ウズラ卵中に蓄積したFabフラグメントを示す。抗体値は3羽のウズラで行った同一の実験結果の平均値を示している。

図9は、ニワトリ卵中に蓄積したFabフラグメントを示す。抗体値は3羽のニワトリで行った同一の実験結果の平均値を示している。

10 図10は、ウズラ卵中に蓄積したFcフラグメントを示す。抗体値は3羽のウズラで行った同一の実験結果の平均値を示している。

図11は、ニワトリ卵中に蓄積したFcフラグメントを示す。抗体値は3羽のニワトリで行った同一の実験結果の平均値を示している。

図12は、抗CD2抗体発現ベクターコンストラクトpMSCV/GΔAL (図12 (A))、pMSCV/GΔAH (図12 (B)) 及びpMSCV/GΔALIH (図12 (C)) の構造を示す。Amp^rはアンピシリン耐性遺伝子を示す。P_{ΔAct}はβ-アクチンプロモーター遺伝子を示す。Ψ+はパッケージングシグナル配列を示す。GFPはグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子を示す。Lは抗CD2抗体軽鎖遺伝子を示す。Hは抗CD2抗体重鎖遺伝子を示す。5'LTR及び3'LTRはそれぞれMoMLVのロングターミナルリピート配列を示す。

15 20

図13は、scFv-Fc抗体発現ベクターコンストラクトpMSCV/GΔAscFv-Fcの構造を示す。Amp^rはアンピシリン耐性遺伝子を示す。P_{ΔAct}はβ-アクチンプロモーター遺伝子を示す。Ψ+はパッケージングシグナル配列を示す。GFPはグリーン・フルオレッセント・プロテイン遺伝子を示す。scFv-FcはscFv-Fc抗体遺伝子を示す。5'LTR及び3'LTRはそれぞれMoMLVのロングターミナルリピート配列を示す。

25

図14は、G0トランスジェニックキメラウズラ血清中に発現したscFv-Fc量を示す。横軸は個体番号、縦軸はscFv-Fc抗体濃度(μg/ml)を示す。

図15は、G0トランスジェニックウズラ卵中に発現したs c F v - F c量をしめす。横軸は産卵開始からの採卵日、縦軸はs c F v - F c抗体濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)を示す。

- 図16は、精製したs c F v - F cのSDS-PAGEによる解析結果を示す。
- 5 レーン1は低分子量マーカー (LMW) を、レーン4は高分子量マーカー (HMW) を示す。レーン2は還元処理したs c F v - F cを、レーン3は還元処理していないs c F v - F cを電気泳動した結果を示す。

発明の詳細な開示

- 10 以下に本発明を詳述する。

本発明のG0トランスジェニックキメラ鳥類は、複製能欠失型レトロウイルスベクターによって外来性抗体遺伝子が導入された鳥類であって、導入遺伝子に由来する抗体を、血中、卵白中あるいは卵黄中に産生することを特徴とする。

- 本発明で使用する鳥類としては、特に限定されず、例えばニワトリ、七面鳥、
- 15 カモ、ダチョウ、ウズラなど、食肉、採卵目的で家畜化されている家禽鳥類や愛玩用鳥類を挙げることができる。なかでもニワトリやウズラは入手が容易で、産卵種としても多産である点が好ましい。

- 本発明で使用するレトロウイルスベクターとしては、モロニー・ミューリン・ロイケミア・ウイルス (MoMLV)、エビアン・ロイコシス・ウイルス (A
- 20 LV) 等に由来するベクターが挙げられる。なかでもMoMLVに由来するものが好ましいが、本発明はこれに限定されるものではない。

- 安全性を考慮し、遺伝子導入ベクターとして用いられるウイルスは、通常ウイルス粒子の複製に必要な3種の遺伝子gag、pol、envのうちのいずれか又は全てを欠くことにより、自己複製能を欠失したウイルスが用いられる。鳥類
- 25 細胞にこのウイルスベクターを効率的に感染させるため、外皮タンパク質を人工的にVSV-G (水疱性口内炎ウイルス由来) シュードタイプとしたウイルスベクターが好ましいが、本発明はこのウイルスタイプに限定されるものではない。

パッケージング細胞またはヘルパーウイルス等を利用することにより調製されたシュードタイプのウイルスベクターは、通常のマイクロインジェクション法 (

B o s s e l m a n , R . A ら (1 9 8 9) S c i e n c e 2 4 3 、 5 3 3)
により、初期胚、血管内、心臓内へ導入される。遺伝子導入法としては、この他
にもリポフェクションやエレクトロポレーション法等が考えられる。

本発明により鳥類に導入される遺伝子は特に限定されないが、マーカー遺伝子
5 や目的タンパク質を発現するための構造遺伝子、これらの遺伝子発現をコントロ
ールするプロモーター遺伝子、分泌シグナル遺伝子等により構成される。

上記マーカー遺伝子としては、ネオマイシン耐性遺伝子、 β -ガラクトシター
ゼ遺伝子、L a c Z 遺伝子、蛍光タンパク質、例えばG F P (グリーン・フロオ
ロレッセント・プロテイン) 等をコードした遺伝子が挙げられる。

10 上記目的タンパク質を発現するための構造遺伝子としては特に制限されず、ヒ
トモノクローナル抗体など遺伝子産業上有用な抗体、酵素等をコードした遺伝子
などが挙げられる。また、その他の有用生理活性物質の遺伝子を用いることもで
きる。特に、卵中での蓄積がよいことから、ヒトI g G クラスの定常領域をもつ
抗体の遺伝子、ヒトI g G 1 のサブクラスの定常領域をもつ抗体の遺伝子、ウズ
15 ラI g G、ニワトリI g GやマウスI g Gの定常領域をもつ抗体の遺伝子など外
来性抗体の構造遺伝子が好ましい。

また好ましい上記構造遺伝子としては、キメラ抗体の構造遺伝子が挙げられる。

キメラ抗体とは、2種以上の異なる遺伝形質から構成される抗体のことをいう。

従来、マウスハイブリドーマによって作製された医療用抗体はマウス由来であ
20 るため、ヒト体内に投与されると免疫系による拒絶反応が引き起こされるという
問題があった。上記キメラ抗体としては、例えば、抗ヒトC D 2 抗体、抗C D 2
O 受容体抗体、抗T N F 抗体など、当該欠点を改良し、マウス抗体のうち抗原タ
ンパク質と結合する領域以外をヒト抗体で置き換え、拒絶反応をなくしたキメラ
抗体が挙げられ、すでに医薬品として上市されているものもある。

25 さらに好ましい上記構造遺伝子としては、s c F v - F c 抗体の構造遺伝子が
挙げられる。

医療用の組換え抗体には、低分子抗体と称される一群がある。免疫グロブリン
I g G には直接抗原と結合する可変領域 (F v : F r a g m e n t o f v a
r i a b l e r e g i o n) と呼ばれるV H、V L のヘテロ二量体からなるド

メインがあり、このF_vドメインはIgGの約5分の1の分子量でありながら、単独で十分な抗原結合能を持つ。V_H、V_Lドメイン間を人工的にペプチドリンカーで結合したものが1本鎖抗体（s c F_v : s i n g l e c h a i n F_v）と呼ばれる低分子抗体で、V_H、V_L単独よりも安定性が向上することが知られていた。

Powersら（Powers, D. Bら（2000）J Immunol Method. 251, 123）は、このs c F_vにヒトIgG1に由来するF_c部を融合させることで、血中での安定性が増すことを見出した。このs c F_v－F_c抗体は医療用として有用と考えられるが、安価な大量生産システムである大腸菌では生産されない。

他の好ましい上記遺伝子配列として、融合タンパクの構造遺伝子が挙げられる。遺伝子組み換えにより2種あるいはそれ以上のタンパクの一部を融合させた人工的な一群のタンパクは融合タンパクと称され、医薬品として実用化されているものに、TNF受容体に免疫グロブリンのF_cを融合させたTNFR－F_cやLFA3にF_cを融合させたLFA3－F_cなどがある。これらはF_cを融合させることで可溶化され、より強力な生理活性をもつように設計された人工タンパクである。

本発明のG0トランスジェニックキメラ鳥類において、鳥類に導入される遺伝子として、これらヒトモノクローナル抗体遺伝子、キメラ抗体遺伝子、s c F_v－F_c抗体遺伝子を使用することにより、従来生産が困難だった抗体医薬品を安価に大量生産できる。

例えば、キメラ抗体遺伝子を導入したG0トランスジェニックキメラ鳥類の場合、血液中の抗体含有量は、好ましくは0.5 μg/ml以上、より好ましくは5 μg/ml以上である。また、卵白中の抗体含有量は、好ましくは0.1 μg/ml以上、より好ましくは1 μg/ml以上であり、卵黄中の抗体含有量は、好ましくは0.1 μg/ml以上、より好ましくは1 μg/ml以上である。

また、s c F_v－F_c抗体遺伝子を導入したG0トランスジェニックキメラ鳥類の場合、血液中の抗体含有量は、好ましくは20 μg/ml以上、より好ましくは2000 μg/ml以上である。また、卵白中の抗体含有量は、好ましくは

5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上、より好ましくは $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上である。卵黄中の抗体含有量は、好ましくは $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上、より好ましくは $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上である。

上記プロモーター遺伝子としては、構成的なプロモーターが挙げられる。抗体
5 遺伝子が構成的なプロモーターにより制御されている場合、抗体遺伝子発現が安定してよいので好ましい。より好ましい構成的なプロモーターとして、ニワトリ β -アクチンプロモーターが挙げられる。

本発明の抗体の生産法は、本発明のG0トランスジェニックキメラ鳥類を作成し、上記G0トランスジェニックキメラ鳥類の血中及び／又は卵中から抗体を回
10 収することを特徴とする。

次に本発明のG0トランスジェニックキメラ鳥類の作製法について説明する。

当該作製法の1つとして、鳥類受精卵を孵卵し、放卵直後の胚盤葉期を除くそれ以降の初期胚へ複製能欠失型レトロウイルスベクターを感染させ、その胚を孵化させる作製法が挙げられる。また、鳥類受精卵を孵卵し、孵卵開始から24時間以降の初期胚へ複製能欠失型レトロウイルスベクターを感染させ、その胚を孵化させる作製法も、本発明の作製法の1つとして挙げられる。
15

より好ましくは、上記初期胚に形成される心臓ないしは血管内へ、複製能欠失型レトロウイルスベクターをマイクロインジェクションする方法である。

つまり、本発明のG0トランスジェニックキメラ鳥類の作製法は、放卵後特定の時間経過した受精卵に複製能欠失型レトロウイルスベクターをマイクロインジェクションすることよりなる。放卵後の受精卵の初期発生についてニワトリを例にとると、まず輸卵管内で受精した卵は、受精後約1.5時間で卵割を開始する。細胞質がつながったまま盤割が始まった卵は、1日かけて体外に放出される間に分裂し、約6万個の細胞からなる胚盤葉と呼ばれる胚になる（胚盤葉期）。この
25 胚盤葉は、卵黄中央部の直径3～4mmの白いリングとして観察される。この胚は、上層と下層に分裂し、割腔を形成する。放卵は胚盤葉下層が形成されるころに起こり、原条が形成され、胚盤葉は上、中、下の三重構造を取り、三胚葉が形成される。その後、胚の形成、成長を経て、排卵から22日目に孵化する。胚盤葉期は、ステージXとも呼ばれ、この時期の細胞の一部から生殖細胞が生じるこ

とから、従来は遺伝子導入の対象としてこの時期の受精卵を使用している。

本発明においては、放卵直後、胚盤葉期の受精卵を孵化条件、例えばニワトリならば37.7～37.8℃、湿度50～70%程度の孵化に適した環境条件に
5 持った時間を0時間とし、これを孵卵開始時として、経時的に各種の処置を行った。ウズラでは孵卵開始から36時間後、ニワトリでは孵卵開始後50時間頃か
ら、卵黄上に血管系の形成が観察され、心臓に分化する器官の脈動が観察できた。

上述の遺伝子を導入した受精卵の孵化には、本発明者らが開発した人工卵殻による方法(Kamihira, M. ら(1998) Develop. Growth Differ., 40, 449)等が応用できる。

10 本発明の作製法において使用する複製能欠失型レトロウイルスベクター、導入する遺伝子、遺伝子導入鳥類としては、上述したG0トランスジェニックキメラ鳥類と同様のものが挙げられる。

上記複製能欠失型レトロウイルスベクターに組み込まれる導入遺伝子は、レトロウイルスに由来しない遺伝子配列を含有することが好ましい。なお本発明の作
15 製法において、「レトロウイルスに由来しない遺伝子」としては、上述した構造遺伝子、プロモーター遺伝子、分泌シグナル遺伝子等が挙げられる。上記レトロウイルスに由来しない遺伝子配列は、ニワトリβ-アクチンプロモーターにより制御されている遺伝子配列であることが好ましく、抗体遺伝子又は融合タンパク遺伝子をコードする遺伝子配列であることが好ましい。

20 本発明の作製法では、 1×10^7 cfu/ml以上、好ましくは 1×10^8 cfu/ml以上、より好ましくは 1×10^9 cfu/ml以上のタイターを持つ複製能欠失型レトロウイルスベクターをマイクロインジェクションすることが、遺伝子を効率よく導入できる点で好ましい。

本発明の作製法で受精卵に遺伝子を導入された鳥類は、その体細胞にモザイク
25 状に導入遺伝子をもったトランスジェニック鳥類として成長する。この一世代目の遺伝子導入鳥類をG0トランスジェニックキメラ鳥類と呼ぶ。

このような本発明の作製法によって得られるG0トランスジェニックキメラ鳥類も、本発明の1つである。

G0トランスジェニックキメラ鳥類と非トランスジェニック鳥類、あるいはG

0 トランスジェニックキメラ鳥類同士を交配させて誕生する二世代目、三世代目が導入遺伝子を染色体にもつ生殖細胞から発生した場合、全身の体細胞に導入遺伝子を含む個体として成長する。G 0 トランスジェニックキメラ鳥類個体から導入遺伝子を受け継ぐ子孫を、代々 G 1 ~ G 2 ~ G 3 トランスジェニック鳥類と称する。

本発明による G 0 トランスジェニックキメラ鳥類を同種の非トランスジェニック鳥類あるいは配偶型 G 0 トランスジェニックキメラ鳥類と交配させることにより、導入遺伝子を子孫に伝播させることができるとともに、全身の体細胞に導入遺伝子をもつ完全なトランスジェニック鳥類を作製できる。完全なトランスジェニック鳥類は、導入遺伝子をもつ体細胞の割合が多いことから、G 0 トランスジェニックキメラ鳥類に比べ、導入遺伝子に由来する組換えタンパク質の産生量が増加することが期待できる。更に、安定的に導入遺伝子を伝播するトランスジェニック鳥類の系統を確立することで、タンパク質産生システムとしての品質の安定化が可能である。

15

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明を詳述するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

20 (実施例 1) β -ガラクトシダーゼ発現ベクターコンストラクトの調製

β -ガラクトシダーゼ発現ベクターコンストラクト pMSCVN Δ A β は、以下のように作製した。

1. プラスミド pLXRN (クロンテック社製) からラウス・ザルコーマ・ウイルス (RSV) プロモーター断片を制限酵素 Xho I 及び Hind III によって切り出し、プラスミド pBlue-script IISK (+) (ストラタジー社製) の Xho I、Hind III サイトへ挿入し、プラスミド pBlue/RSV を作製した。

2. プラスミド p CMV β (クロンテック社製) から β -ガラクトシダーゼ (β -G a l) 遺伝子断片を制限酵素 N o t I によって切り出し、プラスミド p Z e o S V 2 (+) (インビトロジェン社製) の N o t I サイトへ挿入した。T 7 プロモーターと同方向に β -G a l 遺伝子が挿入された構造のプラスミドを p Z e o / l a c Z とした。

3. p B l u e / R S V から R S V プロモーター断片を制限酵素 X h o I 及び P s t I によって切り出した。p Z e o / l a c Z から β -G a l 遺伝子断片を制限酵素 P s t I 及び X h o I によって切り出した。制限酵素 X h o I によって処理したプラスミド p L N H X (クロンテック社製) のベクター断片に上記切り出した 2 断片を連結し、プラスミド p L N R β を作製した。

4. p L N H X から一連のモロニー・ミューリン・ザルコーマ・ウイルス (M o M u S V) 5' - ロング・ターミナル・リピート (L T R) 、ウイルス・パッケージング・シグナル及びネオマイシン耐性 (N e o^r) 遺伝子を含む断片を、制限酵素 S a c I I 及び X h o I によって切り出し、制限酵素 S a c I I 及び X h o I によって処理した p L X R N のベクター断片に連結し、プラスミド p L X L を作製した。

5. p Z e o / l a c Z から β -G a l 遺伝子断片を制限酵素 H i n d I I I 及び X h o I によって切り出し、制限酵素 H i n d I I I 及び X h o I によって処理した p L X L のベクター断片に連結し、プラスミド p L Z L を作製した。

6. 2つの化学合成オリゴヌクレオチド 5' - c g g t c t a g a g g a a t t c a g t g g t t c g - 3' (配列番号 1) 及び 5' - c c a g g a t c c g a c g t t g t a a a a c g a c g - 3' (配列番号 2 ; 下線部は B a m H I 制限酵素サイト) をプライマーとする P C R (94°C / 15 秒 → 55°C / 30 秒 → 72°C / 1 分 30 秒 : 35 サイクル ; K O D - P l u s - D N A ポリメラーゼ (東洋紡社製)) により、プラスミド p M i w Z (S u e m o r i e t a l. ,

1990, Cell Diff. Dev. 29:181-185) からR
SVプロモーターとニワトリ β アクチン (Act) プロモーターのハイブリッド
プロモーター (Miwプロモーター) の5' 領域断片を増幅後、制限酵素Bam
HI及びMunIによって切り出し、プラスミドpGREEN LANTERN
5 -1 (ギブコBRL社製) のBamHI、MunIサイトへ挿入し、プラスミド
pGmiw5' を作製した。

7. pMiwZからMiwプロモーター5' 側中央領域断片を制限酵素MunI
及びClaIによって切り出し、pGmiw5' のMunI、ClaIサイトへ
10 挿入し、プラスミドpGmiw5' -2を作製した。

8. pGmiw5' -2からMiwプロモーター5' 領域及び5' 側中央領域を
含む断片を制限酵素BamHI及びEcoRIによって切り出し、pBlues
cript IISK (+) のBamHI、EcoRIサイトへ挿入し、プラスミ
15 ドpBlue/Miw5' を作製した。

9. 2つの化学合成オリゴヌクレオチド5' -ccaaagcttgccgca
gccattgccctttt-3' (配列番号3; 下線部はHindIII制限
酵素サイト) 及び5' -atacctaggggctggctgcggaggaa
20 ac-3' (配列番号4; 下線部はBlnI制限酵素サイト) をプライマーとす
るPCR (98℃/15秒→60℃/30秒→72℃/30秒: 35サイクル)
によりpMiwZからMiwプロモーター3' 領域断片を増幅後、制限酵素Hin
dIII及びBlnIによって切り出し、制限酵素HindIII及びBln
Iによって処理したpLXLのベクター断片に連結し、プラスミドpLMiw3
25 ' を作製した。

10. pMiwZからMiwプロモーター3' 側中央領域断片を制限酵素Eco
RI及びMboIIによって切り出した。pLMiw3' からMiwプロモータ
ー3' 領域断片を制限酵素MboII及びKpnIによって切り出した。pBl

ue/Miw 5' の EcoRI、KpnI サイトへ上記切り出した 2 断片を挿入し、プラスミド pBlue/Miw を作製した。

11. pBlue/Miw から Miw プロモーター全長を含む断片を制限酵素 BamHI 及び BlnI によって切り出し、制限酵素 BamHI 及び BlnI によって処理した pLXL のベクター断片に連結し、プラスミド pLML を作製した。

12. pLML から Act プロモーター断片を制限酵素 SmaI 及び XbaI で切り出し、pBluescript IISK (+) の EcoRV、XbaI サイトへ挿入し、プラスミド pBlue/Act を作製した。

13. pLML から Miw プロモーター断片を制限酵素 HindIII 及び BglII によって切り出し、制限酵素 HindIII 及び BamHI によって処理した pLZL のベクター断片に連結し、プラスミド pLMβL を作製した。

15

14. pBlue/Act から Act プロモーター断片を制限酵素 SalI 及び BlnI によって切り出した。pLMβL から β-Gal 遺伝子断片を制限酵素 BlnI 及び BglII によって切り出した。制限酵素 XhoI 及び BglII によって処理した pLNRβ のベクター断片に上記切り出した 2 断片を連結し、プラスミド pLNAβ を作製した。

20

15. 2つの化学合成オリゴヌクレオチド 5' - t t t a g c t a g c t g c a g c t c a g t g c a t g c a c - 3' (配列番号 5 ; 下線部は NheI 制限酵素サイト) 及び 5' - a t a a t c t a g a a a c g c a g c g a c t c c c g c - 3' (配列番号 6 ; 下線部は XbaI 制限酵素サイト) をプライマーとする PCR (98℃/15秒→60℃/30秒→68℃/2分:30サイクル) により pMiwZ からイントロン欠失アクチン (ΔAct) プロモーター断片を増幅後、制限酵素 XhoI (XhoI 制限酵素サイトは増幅断片中に存在) 及び XbaI によって ΔAct プロモーターの一部を含む断片を切り出した。ΔAct プ

25

ロモーターの残りの部分と β -G a l 遺伝子を含む断片を p L N A β から制限酵素 B l n I 及び B g l I I I によって切り出した。制限酵素 X b a I 及び B g l I I I によって処理した p L N A β のベクター断片に上記切り出した 2 断片を連結し、プラスミド p L N Δ A β を作製した。

5

16. p L N Δ A β から一連の N e o^r 遺伝子、 Δ A c t プロモーター、及び β -G a l 遺伝子を含む断片を制限酵素 B l n I 及び B g l I I I によって切り出し、制限酵素 B l n I 及び B g l I I I によって処理した p L X L のベクター断片に連結し、プラスミド p L N Δ A β - 2 を作製した。

10

17. p L N Δ A β - 2 から一連の N e o^r 遺伝子、 Δ A c t プロモーター、及び β -G a l 遺伝子を含む断片を制限酵素 B a m H I 及び B g l I I I によって切り出し、制限酵素 B a m H I 及び B g l I I I によって処理したプラスミド p M S C V n e o (クロンテック社製) のベクター断片に連結した。B a m H I 及び B g l I I I サイトが消失したプラスミドを p M S C V N Δ A β とした。

15

このように作製した複製能欠失型レトロウイルスベクターのベクターコンストラクト p M S C V N Δ A β の構造を図 1 に示した。

(実施例 2) β -ガラクトシダーゼ発現レトロウイルスベクターの調製

20

実施例 1 で作製したベクターコンストラクト p M S C V N Δ A β よりレトロウイルスベクターを調製するため、パッケージング細胞 G P 2 9 3 (クロンテック社製) を直径 100 mm の培養ディッシュに 5×10^6 細胞植え、培養した。培地を新鮮な DMEM (ダルベッコ変法イーグル培地) に交換し、p-V S V -G ベクター (クロンテック社製) 8 μ g と p M S C V N Δ A β 8 μ g をリポフェクション法により前記 G P 2 9 3 細胞に導入した。48 時間後、ウイルス粒子を含む培養上清を回収し、0.45 μ m 酢酸セルロースフィルター (アドバンテック社製) を通して、夾雑物を除去した。得られた溶液にポリブレン (シグマ社製) を 10 μ g / m l となるように加えウイルス液とした。

25

調製したウイルス液を別に培養した G P 2 9 3 細胞に加え、48 時間培養後、

600 μ g/ml の G418 (GIBCO BRL 社製) を含む培養液で植え継ぎ、G418 安定形質転換 GP293 株を取得した。

得られた安定形質転換株を 80%コンフルエントとなるよう直径 100 mm ディッシュに培養し、16 μ g の pVSV-G ベクターをリポフェクション法で導入した。48 時間後ウイルス粒子を含む培養上清 12 ml を回収した。

この培養上清を 50,000 \times g、4°C で 1.5 時間遠心を行い、ウイルスを沈殿させた。上清を除き、ウイルス粒子を含む沈殿物に 50 μ l の 50 mM Tris-HCl (pH 7.8)、130 mM NaCl、1 mM EDTA 溶液を加え、4°C で一晩放置後、よく懸濁してウイルス溶液を回収した。このようにして得られた高タイターウイルスベクターは、 $10^8 \sim 10^9$ cfu/ml であった。

ウイルスタイターの測定は、以下のように行った。測定の前日に NIH3T3 細胞 (アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより入手) を直径 35 mm のディッシュに 7×10^4 細胞植え、培養した。 $10^2 \sim 10^6$ 倍に希釈したウイルス溶液を各ディッシュに 1 ml 加え、48 時間後に蛍光顕微鏡により GFP (グリーン・フルオレッセント・プロテイン) を発現している細胞の割合を測定し、以下の計算式によりタイターを決定した。

ウイルスタイター = 細胞数 \times 希釈率 \times 発現割合 (cfu/ml)

20 (実施例 3) ウズラ胚へのレトロウイルスベクターのインジェクション

WE 系統のウズラ受精卵 (日本生物科学研究所) を使用した。この受精卵を自動転卵装置が内蔵された孵卵器 (昭和フランキ社製 P-008 型) 内で 37.9°C、湿度 65% 環境に置いた時刻を孵卵開始時刻 (0 時間) とし、以後 15 分毎に 90 度転卵しながら孵卵を行った。

25 孵卵開始時、受精卵の卵殻を 70% エタノールで消毒し、鋭端部を直径 2 cm の円形にダイヤモンドカッター (MINIMO 7C710、ミニター社製) で切り取り、胚を露出させた。胚盤葉を実体顕微鏡で観察しながら、ガラス管 (CD-1、オリンパス社製) をマイクロピペット製作器 (PC-10、オリンパス社製) で加工し、外径約 20 μ m となるよう先端を折って作製した針を刺し、マイ

クロインジェクター (Transjector 5246、エッペンドルフ社製) を用いて、胚盤下腔の中央に実施例 2 で調製したウイルス溶液約 $2 \mu\text{l}$ を微量注入した。この卵殻の切り口まで卵白を満たした後、卵白を糊としてテフロン膜 (ミリラップ、ミリポア社製) とポリ塩化ビニリデンラップ (サランラップ、旭化成社製) とで蓋をし、15 分毎に 90 度転卵しながら孵卵を行った。

孵卵開始から 12 時間後、24 時間後の受精卵に同様の方法でウイルスを注入した。孵卵後約 36 時間目から卵黄表面に血管の発生が認められ、その一部が脈動して心臓の原基となることが実体顕微鏡で観察できる。孵卵後 36 時間、48 時間、55 時間の心臓内へ、実施例 2 で調製したウイルス溶液 $2 \mu\text{l}$ をマイクロインジェクターにより微量注入した。

(実施例 4) ニワトリ胚へのレトロウイルスベクターのインジェクション

ニワトリ受精卵 (日本生物科学研究所) を使用した。この受精卵を自動転卵装置が内蔵された孵卵器 (昭和フランキ社製 P-008 型) 内で 37.9°C 、湿度 65% 環境に置いた時刻を孵卵開始時刻 (0 時間) とし、以後 15 分毎に 90 度転卵しながら孵卵を行った。

孵卵開始時、受精卵の卵殻を 70% エタノールで消毒し、鋭端部を直径 3.5 cm の円形にダイヤモンドカッター (MINIMO 7C710、ミニター社製) で切り取り、胚を露出させた。胚盤葉を実体顕微鏡で観察しながら、ガラス管 (CD-1、オリンパス社製) をマイクロピペット製作器 (PC-10、オリンパス社製) で加工し、外径約 $20 \mu\text{m}$ となるよう先端を折って作製した針を刺し、マイクロインジェクター (Transjector 5246、エッペンドルフ社製) を用いて胚盤下腔の中央に、実施例 2 で調製したウイルス溶液約 $2 \mu\text{l}$ を微量注入した。この卵殻の切り口まで卵白を満たした後、卵白を糊としてテフロン膜 (ミリラップ、ミリポア社製) とポリ塩化ビニリデンラップ (サランラップ、旭化成社製) とで蓋をし、15 分毎に 90 度転卵しながら孵卵を行った。

孵卵開始から 12 時間後、24 時間後の受精卵を同様に処理した。孵卵後約 50 時間目から卵黄表面に血管の発生が認められ、その一部が脈動して心臓の原基となることが実体顕微鏡で観察できる。孵卵後 50 時間、55 時間、60 時間の

心臓内へ、実施例 2 で調製したウイルス溶液 $2 \mu\text{l}$ をマイクロインジェクターにより微量注入した。

(実施例 5) β -ガラクトシダーゼ活性測定

- 5 孵卵開始から 115 時間後、胚を卵殻より取り出し PBS (リン酸緩衝液) にて洗浄し、胚をとり囲む膜を取り除いた。摘出した胚を細かくせん断し、0.8 ml の反応バッファー (10 mM KCl、1 mM MgCl_2 、0.1% Triton X-100 (和光純薬工業製)、5 mM 2-メルカプトエタノール (和光純薬工業製)、2 mM リン酸バッファー pH 7.5) を加えて超音波破碎し、細胞液を得た。

- 0.6 ml の細胞液を、37°C で 10 分間インキュベートし、あらかじめ暖めておいた 4 mg/ml の α -ニトロフェニル- β -D-ガラクトピラノシド (ONPG) (シグマ社製) を 0.1 M リン酸バッファー (pH 7.5) に溶解した液 0.1 ml を添加した。反応後 0.3 ml の 1 M Na_2CO_3 (和光純薬工業製) を加え、吸光度計にて 420 nm の波長強度を計測した。

β -ガラクトシダーゼの活性は ONPG unit で表した (1 unit: 1 μmol の α -ニトロフェノールが 1 分間に生成されるとき活性)。3 回実験を行い、その平均値を β -ガラクトシダーゼ活性とした。

- ニワトリおよびウズラの、遺伝子導入時期と β -ガラクトシダーゼ活性測定結果との関係を図 2、図 3 に示した。ウズラでは孵卵後 48 時間後、ニワトリでは孵卵後 55 時間後に導入した β -ガラクトシダーゼ遺伝子は、それ以前の時期に導入されたものに比べ、強く発現した。これは鳥類受精卵が、レトロウイルスによる外来遺伝子を不活性化する (サイレンシング) メカニズムが受精直後に顕著であり、時間を経るごとに弱くなっていくことを示唆する。このことから、鳥類の種類によって決まる特定の時間経過した受精卵に目的遺伝子を導入することで、不活性化されことなく効率的に導入遺伝子を発現する G0 トランスジェニックキメラ鳥類の作製が可能になる。

(実施例 6) ウイルスタイターによる遺伝子発現の効率

実施例 2 で調製した 1×10^8 c f u / m l のウイルス液を、希釈溶媒 (50 m M T r i s - H C l (p H 7. 8)、130 m M N a C l、1 m M E D T A 溶液) で 10 倍、100 倍、1000 倍に 3 段階希釈し、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 c f u / m l のタイター・ウイルス溶液とした。ウズラ受精卵を孵卵し、48 時間後の発生初期心臓に、調製したウイルス液 2μ l をマイクロインジェクションした。同様にして 48 時間後の発生初期心臓に希釈溶媒のみを 2μ l インジェクションしたものを対照とした。

孵卵開始から 115 時間後、実施例 5 に準じて β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。ウズラでのウイルスタイターと遺伝子発現結果との関係を図 4 に示した。

10 同様にニワトリ受精卵を孵卵し、55 時間後の発生初期心臓に、調製したウイルス液 2μ l をマイクロインジェクションした。55 時間後の発生初期心臓に希釈溶媒のみを 2μ l インジェクションしたものを対照とした。

孵卵開始から 115 時間後、実施例 5 に準じて β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。ニワトリでのウイルスタイターと遺伝子発現結果との関係を図 5 に示した。

15 た。

1×10^8 c f u / m l のウイルスが注入されたウズラおよびニワトリで顕著な β -ガラクトシダーゼ活性が確認され、それ以下の濃度では発現量は低かった。導入遺伝子の発現にはウイルスタイターが大きく影響すること、すなわち本発明による G0 トランスジェニックキメラ鳥類で、導入遺伝子を効率的に発現させるためには高タイターの複製能欠失型ベクターを使用するのが有効であるということが示唆された。

20

(実施例 7) ヒト抗体のウズラ、ニワトリ卵内への移行性

3 種のサブクラスをもつヒト抗体 (I g G 1、2、3) (コスモバイオ社製) を混合したもの、および対応する 3 種の抗体フラグメント (F a b - 1、F a b - 2、F a b - 3、F c - 1、F c - 2、F c - 3) (コスモバイオ社製) を 100 μ g / m l となるよう P B S で希釈し、希釈液 100 μ l をウズラ成鳥 (3 羽) またはニワトリ成鳥 (3 羽) の翼下静脈に注射した。

25

抗体を静脈に注射した翌日から 20 日目まで採卵を行い、卵中に移行した抗体

を定量した。卵黄は50% (W/V)、卵白は10% (V/V) となるようPBSを用いて希釈し、凍結保存して測定用サンプルとした。

(実施例8) ELISA法による卵黄中抗体の定量

- 5 PBSで希釈した抗ヒトIgG抗体（コスモバイオ社製）をELISAプレートに100 μ g/well入れて、4℃で一晩静置した。PBS-0.05% Tween 20溶液を200 μ lで各wellを3回洗浄した後、PBS-0.05% Tween 20溶液-2%スキムミルクを150 μ l/well入れた。

- 10 室温で2時間静置後、wellを200 μ lのPBS-0.05% Tween 20溶液で3回洗浄し、採取した血液、卵白、卵黄サンプルを120 μ l入れ、4℃で一晩静置した。このELISAプレートを室温に戻した後、PBS-Tween 20溶液で3回各wellを洗浄し、PBS-0.05% Tween 20溶液で希釈したPeroxide (POD) 標識抗ヒトIgG抗体（コスモバイオ社製）を100 μ l/well入れて、室温で1時間静置した。

- 15 PBS-0.05% Tween 20溶液でwellを4回洗浄し、発色液（10mgのオ-フェニレンジアミン（片山化学工業製）を1mlのメタノールに溶解し、蒸留水で100mlとしたものに、10 μ lの過酸化水素水（和光純薬工業製）を加えて調製した）100 μ lをwellに加えた。8M硫酸を50 μ l添加して反応を止め、490nmの蛍光強度をプレートリーダーで測定して、標準検量線から濃度を計算した。ウズラ、ニワトリ各々3羽から得られたサンプルの抗体濃度を平均したものを結果とした。

標準検量線作製のための標準抗体（コスモバイオ社製）は、50%卵黄-PBS (W/V) で希釈した。

- 25 ウズラおよびニワトリの卵中に蓄積された抗体濃度を図6、7に示した。ウズラおよびニワトリの卵中に蓄積されたFab, Fcフラグメント濃度を図8、9、10、11に示した。

ウズラ、ニワトリにおいて、ヒトIgG抗体、サブクラスではヒトIgG2、ヒトIgG1が効率よく卵中に蓄積されることが示された。またFcフラグメントが卵内への高い移行性を示したことから、ヒトIgGの移行はFcレセプター

を介したものであることが示唆された。

(実施例 9) 抗CD2抗体発現ベクターコンストラクトの作製

抗CD2抗体発現用ベクターコンストラクトpMSCV/GΔAH、pMSCV/GΔAL及びpMSCV/GΔALIHは、以下のように作製した。

1. ヒト抗体 (IgM) 産生ハイブリドーマ細胞D253-15-6 (アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション HB-8789) からQuick Prep Micro mRNA Purification Kit (ファルマシア社製) を用いてmRNAを取得し、得られたmRNAからFirst-Strand cDNA Synthesis Kit (ファルマシア社製) を用いてcDNAライブラリを調製した。2つの化学合成オリゴヌクレオチド5' - atcctcgaggccaaagtacagtg - 3' (配列番号7; 下線部はXhoI制限酵素サイト) 及び5' - cccggaatccctaactctccccctgttgaaagct - 3' (配列番号8; 下線部はBamHI制限酵素サイト) をプライマーとするPCR (94°C/1分→50°C/1分→72°C/1分30秒: 25サイクル; Taq DNAポリメラーゼ (パーキンエルマー社製)) により上記cDNAライブラリからヒト抗体L鎖κ定常領域 (hCκ) の遺伝子断片を増幅後、制限酵素XhoI及びBamHIによって切り出し、プラスミドpBluescript I IKS (-) (ストラタジーン社製) のXhoI、BamHIサイトへ挿入し、プラスミドpBlue/hCκを作製した。

2. 同様にして、2つの化学合成オリゴヌクレオチド5' - agcggccgcctacaggtgtccactccgacatcgatgacccagctctcc - 3' (配列番号9; 下線部はNotI制限酵素サイト) 及び5' - ctctcgaggatagaagtatttcagcaggccacac - 3' (配列番号10; 下線部はXhoI制限酵素サイト) をプライマーとするPCRにより上記cDNAライブラリからヒト抗体L鎖可変領域 (hVL) の遺伝子断片を増幅後、制限酵素NotI及びXhoIによって切り出し、pBluescript

i p t I I K S (－) の N o t I、X h o I サイトへ挿入し、プラスミド p B l u e / h V L を作製した。

3. 同様にして、2つの化学合成オリゴヌクレオチド 5' - a c c t c g a g c
 5 g t g g c c g t t g g c t g c c t c g c a c a - 3' (配列番号 11; 下線
 部は X h o I 制限酵素サイト) 及び 5' - a c t a a g c t t a c g t t g t a
 c a g g g t g g g t t t a c c - 3' (配列番号 12; 下線部は H i n d I I
 I 制限酵素サイト) をプライマーとする P C R により上記 c D N A ライブラリか
 らヒト抗体 H 鎖 μ 定常領域 (h C μ) の遺伝子断片を増幅後、制限酵素 X h o I
 10 及び H i n d I I I によって切り出し、p B l u e s c r i p t I I K S (－)
 の X h o I、H i n d I I I サイトへ挿入し、プラスミド p B l u e / h C μ を
 作製した。

4. 同様にして、2つの化学合成オリゴヌクレオチド 5' - a g c g g c c g c
 15 t a c a g g t g t c c a c t c c g a g g t g c a g c t g g t g g a g t c
 t g g - 3' (配列番号 13; 下線部は N o t I 制限酵素サイト) 及び 5' - c
 a c g c t c g a g g t a t c c g a c g g g g a a t t c t c a c a g g a -
 3' (配列番号 14; 下線部は X h o I 制限酵素サイト) をプライマーとする P
 C R により上記 c D N A ライブラリからヒト抗体 H 鎖可変領域 (h V H) の遺伝
 20 子断片を増幅後、制限酵素 N o t I 及び X h o I によって切り出し、p B l u e
 s c r i p t I I K S (－) の N o t I、X h o I サイトへ挿入し、プラスミド
 p B l u e / h V H を作製した。

5. p B l u e / h C κ から h C κ 遺伝子断片を制限酵素 X h o I 及び B a m H
 25 I によって切り出し、プラスミド p C E P 4 (インビトロジェン社製) の X h o
 I、B a m H I サイトへ挿入し、プラスミド p C E P 4 / h C κ を作製した。

6. 2つの化学合成オリゴヌクレオチド 5' - c c c a a g c t t g a t c t c
 c a c t g g g a t g g t g g g g g c c c t c c t c t t g c t g c t g - 3

’ (配列番号15; 下線部はHindIII制限酵素サイト) 及び5’ - c c c
g g a t c c t c a g t c a a g g c g c c t t c g c a t g a a g a g g c c
g a t c c c c a g g g c c a c c a c c a g c a g c a a g a g g a g g g c
c c c - 3’ (配列番号16; 下線部はBamHI制限酵素サイト) を21bp
5 sにわたって相補的な3’末端でアニールさせ、T4 DNAポリメラーゼ(宝
酒造社製)を用いたDNA2重鎖合成反応によって上皮増殖因子受容体膜貫通領
域(TM)の遺伝子断片を調製した。得られたTM遺伝子断片を制限酵素Hin
dIII及びBamHIによって処理後、pBlue-scriptIIKS(-
)のHindIII、BamHIサイトに挿入し、プラスミドpBlue/TM
10 を作製した。

7. pBlue/hC μ からhC μ 遺伝子断片を制限酵素XhoI及びHind
IIIによって切り出し、pBlue/TMのXhoI、HindIIIサイト
へ挿入し、プラスミドpBlue/hC μ TMを作製した。
15

8. pBlue/hC μ TMから一連のhC μ 遺伝子及びTM遺伝子を含む断片
を制限酵素XhoI及びBamHIによって切り出し、pCEP4のXhoI、
BamHIサイトへ挿入し、プラスミドpCEP4/hC μ TMを作製した。

20 9. pCEP4/hC μ TMを制限酵素BamHIによって切断し、末端をT4
DNAポリメラーゼによって平滑処理後、セルフライゲーションによりプラス
ミドpCEP4/hC μ TM Δ Bを作製した。

10. 化学合成オリゴヌクレオチド5’ - t g a a g a c a g a t g g c g c c
25 g c c a c a g t t c g t t t - 3’ (配列番号17; 下線部はNarI制限酵
素サイト)を用いた部位特異的変異導入によりpBlue/hVLが保有するh
VLの3’末端にアミノ酸暗号の変更を伴わずに制限酵素NarIサイトを導入
し、プラスミドpBlue/hVLNを作製した。

1 1. 化学合成オリゴヌクレオチド5' - t g g g g c g g a t g c g g a t c
c t g a g g a g a c g g t - 3' (配列番号18; 下線部はB a m H I 制限酵
 素サイト) を用いた部位特異的変異導入により p B l u e / h V H が保有する h
 V H の 3' 末端にアミノ酸暗号の変更を伴わずに制限酵素 B a m H I サイトを導
 5 入し、プラスミド p B l u e / h V H B を作製した。

1 2. 抗ヒトCD2マウス抗体産生ハイブリドーマ細胞T S 2 / 1 8. 1. 1 (
 アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション H B - 1 9 5) から Q u i c
 k P r e p M i c r o m R N A P u r i f i c a t i o n K i t を用
 10 いてmRNAを取得し、得られたmRNAからF i r s t - S t r a n d c D
 N A S y n t h e s i s K i t を用いてcDNAライブラリを調製した。2
 つの化学合成オリゴヌクレオチド5' - c g c g g c c g c c t c a g g g a a
a g t t t t g a a g a t g - 3' (配列番号19; 下線部はN o t I 制限酵素サ
 イト) 及び5' - c g g c g c c g c c a c a g t c c g t t t t a t t t c c
 15 a g c t t g g t - 3' (配列番号20; 下線部はN a r I 制限酵素サイト) を
 プライマーとするPCRにより上記cDNAライブラリからマウス抗体L鎖可変
 領域(mVL)の遺伝子断片を増幅後、制限酵素N o t I 及びN a r I によって
 切り出し、p B l u e / h V L N の N o t I、N a r I サイトへ挿入し、プラス
 ミド p B l u e / m V L を作製した。

20

1 3. 同様にして、2つの化学合成オリゴヌクレオチド5' - c g c g g c c g
c g a a c a c g g a m c c c t c a c c a t g - 3' (配列番号21; 下線部
 はN o t I 制限酵素サイト) 及び5' - c g g a t c c c t g c a g a g a c a g
t g a c c a g a g t - 3' (配列番号22; 下線部はB a m H I 制限酵素サイ
 25 ト) をプライマーとするPCRにより上記cDNAライブラリからマウス抗体H
 鎖可変領域(mVH)の遺伝子断片を増幅後、制限酵素N o t I 及びB a m H I
 によって切り出し、p B l u e s c r i p t I I K S (-) の N o t I、B a m
 H I サイトへ挿入し、プラスミド p B l u e / m V H を作製した。

14. pBlue/mVLからmVL遺伝子断片を制限酵素Not I及びXho Iによって切り出し、pCEP4/hC κ のNot I、Xho Iサイトへ挿入し、プラスミドpCEP4/Ig L κ を作製した。

- 5 15. pBlue/hVHBからhVH遺伝子断片を制限酵素Not I及びXho Iによって切り出し、pCEP4/hC μ TM Δ BのNot I、Xho Iサイトへ挿入し、プラスミドpCEP4/hIgH μ TMを作製した。

- 10 16. pBlue/mVHからmVH遺伝子断片を制限酵素Not I及びBam HIによって切り出し、制限酵素Not I及びBam HIによって処理したpCEP4/hIgH μ TMのベクター断片に連結し、プラスミドpCEP4/IgH μ TMを作製した。

- 15 17. プラスミドpMSCVneo（クロンテック社製）から一連のミューリン・ホスホグリセレート・キナーゼ（PGK）プロモーター及びNeo^r遺伝子を含む断片を制限酵素Bgl II及びBam HIによって除去し、残ったベクター断片のセルフライゲーションによりプラスミドpMSCVを作製した。

- 20 18. プラスミドpGREEN LANTERN-1（ギブコBRL社製）からGFP遺伝子断片を制限酵素Not Iによって切り出し、pZeoS V2（+）のNot Iサイトに挿入した。T7プロモーターと同方向にGFP遺伝子が挿入された構造のプラスミドをpZe o/GFPとした。

- 25 19. pZe o/GFPからGFP遺伝子断片を制限酵素Eco RI及びXho Iによって切り出し、制限酵素Eco RI及びXho Iによって処理したpMSCVのベクター断片に連結し、プラスミドpMSCV/Gを作製した。

20. ヒト抗体（IgG1）産生ミエローマ細胞IM-9（ジャパニーズ・コレクション・オブ・リサーチ・バイオリソースズ 0024）からmRNA is

olation Kit (ロッシュ社製) を用いて mRNA を取得し、得られた mRNA から ReverTra Ace (東洋紡社製) を用いて cDNA ライブラリを調製した。2つの化学合成オリゴヌクレオチド 5' - c a a g c t t c a a g g g c c c a t - 3' (配列番号 23) 及び 5' - a t t t a c c c g g a g a c a g g g a - 3' (配列番号 24) をプライマーとする PCR (95°C/2分→52°C/30秒→74°C/3分:30サイクル; Pfu DNAポリメラーゼ (プロメガ社製)) により上記 cDNA ライブラリからヒト抗体 H 鎖 γ 1 定常領域 (hC γ 1) の遺伝子断片を増幅した。さらに、2つの化学合成オリゴヌクレオチド 5' - a t a g g a t c c g c t a g c t t c a a g g g c c c a t c g - 3' (配列番号 25; 下線部は BamHI 制限酵素サイト) 及び 5' - a g c a a g c t t t c a t t t a c c c g g a g a c a g g g a - 3' (配列番号 26; 下線部は HindIII 制限酵素サイト) をプライマーとする PCR (94°C/15秒→58°C/30秒→68°C/1分:30サイクル; KOD-plus-DNAポリメラーゼ) により上記 PCR 産物から hC γ 1 遺伝子断片を増幅後、制限酵素 BamHI 及び HindIII によって切り出し、pBlue-script IISK (+) の BamHI、HindIII サイトへ挿入し、プラスミド pBlue/hC γ 1 を作製した。

21. pCEP4/IgH μ TM から mVH 遺伝子断片を制限酵素 HindIII 及び BamHI によって切り出した。pBlue/hC γ 1 から hC γ 1 遺伝子断片を制限酵素 BamHI 及び HindIII によって切り出した。制限酵素 HindIII によって処理したプラスミド pETBlue-2 (ノバジェン社製) のベクター断片に上記切り出した 2 断片を連結し、プラスミド pETBlue/IgH γ 1 を作製した。

25

22. pETBlue/IgH γ 1 から抗体 H 鎖 γ 1 (IgH γ 1) の遺伝子断片を制限酵素 HindIII によって切り出し、pMSCV/G の HindIII サイトへ挿入した。GFP 遺伝子と同方向に IgH γ 1 遺伝子が挿入された構造のプラスミドを pMSCV/GH とした。

23. 2つの化学合成オリゴヌクレオチド5' - a c g c g t c g a c g t g c
a t g c a c g c t c a t t g - 3' (配列番号27; 下線部はS a l I制限酵
素サイト) 及び5' - a c g c g t c g a c a a c g c a g c g a c t c c c g
5 - 3' (配列番号28; 下線部はS a l I制限酵素サイト) をプライマーとする
PCR (94°C/15秒→50°C/30秒→68°C/1分: 10サイクル; 94
°C/15秒→62°C/30秒→68°C/1分: 30サイクル) により pMiwZ
からΔA c tプロモーター断片を増幅後、制限酵素S a l IによってΔA c tプ
ロモーター断片を切り出し、pETB l u e - 2のS a l Iサイトへ挿入し、プ
10 ラスミドpETB l u e / ΔA c tを作製した。

24. pETB l u e / ΔA c tからΔA c tプロモーター断片を制限酵素S a
l Iによって切り出し、pMSCV / GHのX h o Iサイトへ挿入した。I g H
γ 1遺伝子と同方向にΔA c tプロモーターが挿入された構造のプラスミドをp
15 MSCV / G ΔA Hとした。

25. 2つの化学合成オリゴヌクレオチド5' - a a t g t c g a c a t g g t
g t c c a c t t c t c a g c t c - 3' (配列番号29; 下線部はS a l I制
限酵素サイト) 及び5' - t t c g t c g a c c t a a c a c t c t c c c c t
20 g t t g a a - 3' (配列番号30; 下線部はS a l I制限酵素サイト) をプラ
イマーとするPCR (95°C/30秒→50°C/30秒→74°C/2分: 10サ
イクル; 95°C/30秒→60°C/30秒→74°C/2分: 30サイクル; P f
u DNAポリメラーゼ) により pCEP 4 / I g L κから抗体L鎖κ (I g L
κ) の遺伝子断片を増幅後、制限酵素S a l Iによって切り出し、pETB l u
25 e - 2のS a l Iサイトへ挿入し、プラスミドpETB l u e / I g L κを作製
した。

26. pETB l u e / ΔA c tからΔA c tプロモーター断片を制限酵素S a
l Iによって切り出し、pMSCV / GのX h o Iサイトへ挿入した。G F P遺

伝子と同方向に $\Delta A c t$ プロモーターが挿入された構造のプラスミドをpMSCV/G ΔA とした。

27. pETBlue/Ig κ からIg κ 遺伝子断片を制限酵素SalIによって切り出し、pMSCV/G ΔA のSalIサイトへ挿入した。 $\Delta A c t$ プロモーターと同方向にIg κ 遺伝子断片が挿入された構造のプラスミドをpMSCV/G $\Delta A L$ とした。

28. 2つの化学合成オリゴヌクレオチド5' - a c g c g t c g a c c g c c
c c t c t c c c t c c c c c - 3' (配列番号31; 下線部はSalI制限酵素サイト) 及び5' - c c g c t c g a g a t t a t c a t c g t g t t t t t
c a a a g g a a a a c c a c g t c - 3' (配列番号32; 下線部はXhoI制限酵素サイト) をプライマーとするPCR (94°C/15秒→60°C/30秒→68°C/1分: 30サイクル) によりプラスミドpLXIN (クロンテック社製) からIRES断片を増幅後、制限酵素SalI及びXhoIによって切り出し、pETBlue-2のSalI、XhoIサイトへ挿入し、プラスミドpETBlue/IRESを作製した。

29. pETBlue/IRESからIRES断片を制限酵素SalI及びXhoIによって切り出し、pMSCV/G $\Delta A H$ のSalIサイトへ挿入した。IgH $\gamma 1$ 遺伝子と同方向にIRESが挿入された構造のプラスミドをpMSCV/G $\Delta A I H$ とした。

30. pETBlue/Ig κ からIg κ 遺伝子断片を制限酵素SalIによって切り出し、pMSCV/G $\Delta A I H$ のSalIサイトへ挿入した。 $\Delta A c t$ プロモーターと同方向にIg κ 遺伝子断片が挿入された構造のプラスミドをpMSCV/G $\Delta A L I H$ とした。

このように作製した複製能欠失型レトロウイルスベクターのベクターコンストラクトpMSCV/G $\Delta A H$ 、pMSCV/G $\Delta A L$ 及びpMSCV/G $\Delta A L I H$

I Hの構造を図12に示した。

(実施例10) 抗CD2抗体発現G0トランスジェニックキメラウズラの作製
実施例2に準じて、ベクターコンストラクトpMSCV/GΔAH、pMSC
5 V/GΔAL及びpMSCV/GΔALIHより3種類のレトロウイルスベクター
を調製した。このレトロウイルスベクターのタイターを測定したところ、 10^8 cfu/ml $\sim 10^9$ cfu/mlだった。

得られたレトロウイルスベクターを、実施例3に準じて孵卵後36時間のウズ
ラ受精卵心臓にマイクロインジェクションし、37.9℃、湿度65%で15分
10 毎に90度転卵させながら孵卵した。

軽鎖(Light Chain)、重鎖(Heavy Chain)からなる
抗体をトランスジェニック動物で発現させるには、軽鎖、重鎖それぞれを発現さ
せるベクターを各々単独で導入する方法と、軽鎖を発現する遺伝子と重鎖を発現
する遺伝子をIRESのような配列で区切り、同一のベクターとして導入する方
15 法が考えられる。そこでインジェクションは、pMSCV/GΔAH、pMSC
CV/GΔALを同時に感染させた場合(実施例11、実験例1)と、pMSC
V/GΔALIHより調製したベクターを単独で導入した場合(実施例11、実
験例2)に分けて行った。

孵卵48時間後、発生が正常に進行していることを確認し、ニワトリのSサイ
20 ズの卵殻の鈍端部に直径4cmの穴を開けたものに、このウイルス導入胚を移し
た。胚を上にして空気に触れるようにし、濃度50mg/mlで卵白に懸濁した
乳酸カルシウム(シグマ社製)溶液を0.5ml添加後、卵白を糊としてラップ
で密閉した。再度孵卵器に入れ、37.9℃、湿度65%で1時間毎に60度転
卵しながら13日間培養した。転卵を止めて静置状態にし、胚が肺呼吸に移行し
25 たら、ラップに針で小さな穴を開け、呼吸を助けた。漿尿膜の血が引いたら培養
器から雛を出し、孵化させた。

(実施例11) 血清中、卵中の抗CD2抗体濃度の測定

実施例10により孵化させたG0トランスジェニックキメラウズラを1ヶ月間

飼育して雛を成長させた。30日後および60日後、成長したG0トランスジェニックウズラの翼下静脈より採血を行い、血液サンプルを得た。得られた血液を15,000rpmで10分間遠心し、上清として得られる血清から抗CD2抗体量の測定を行った。

- 5 孵化から1.5ヵ月後、産卵を始めた雌性トランスジェニックウズラより採卵を行い、実施例7に準じて調製した卵白、卵黄中の抗CD2抗体量を、実施例8に準じてELISA法により定量した。

実験例1、実験例2の定量結果を示す。

10 (実験例1)

pMSCV/GΔAH、pMSCV/GΔALから調製したベクター ($3 \sim 4 \times 10^8$ cfu/ml) を同時に感染させたG0トランスジェニックキメラウズラ (個体識別番号#1113) は、卵黄中に $0.6 \mu\text{g/ml}$ 、卵白中に $0.5 \mu\text{g/ml}$ の抗CD2抗体を発現した。

15

(実験例2)

pMSCV/GΔALIHより調製したベクター (5×10^8 cfu/ml) を単独で導入したG0トランスジェニックキメラウズラ (#4202) は、血清中に $5.2 \mu\text{g/ml}$ の抗CD2抗体を発現した。

20

(実施例12) scFv-Fc抗体発現ベクターコンストラクトの作製

ScFv-Fc抗体発現ベクターコンストラクトpMSCV/scFv-Fcは、以下のように作製した。

- 25 1. 5'末端をリン酸化した2つの化学合成オリゴヌクレオチド5' - c t a g
a c c a t g a g g t c t t t g c t a a t c t t g g t g c t t t g c t t c
c t g c c c c t g g c t g c t c t g g g g - 3' (配列番号33; c t a g
aはXbaI認識部位末端、g gはHaeIII認識部位末端) 及び5' - c c
c c a g a g c a g c c a g g g g c a g g a a g c a a a g c a c c a a g a

t t a g c a a a g a c c t c a t g g t - 3' (配列番号 34 ; c c は X b a I 認識部位末端、t は H a e I I I 認識部位末端) をアニールさせ、リゾチーム分泌シグナルの遺伝子断片を調製した。2つの化学合成オリゴヌクレオチド 5' - g c g t t t a a a g t g a c g t t g g a c g t c c g - 3' (配列番号 35 ; t t t a a a は D r a I 制限酵素サイト) 及び 5' - a t t a g g a t c c g c g c t t a a g g a c g g t c a g g - 3' (配列番号 36 ; g g a t c c は B a m H I 制限酵素サイト) をプライマーとする P C R (94℃/15秒→58℃/30秒→68℃/1分:30サイクル; K O D - P l u s - D N A ポリメラーゼ) により、H U C 2 - 1 3 細胞のニワトリ抗体可変領域遺伝子から調製された一本鎖抗体 (s c F v) の遺伝子を含んだプラスミド p P D S / s c F v (N a k a m u r a e t a l . , 2000, C y t o t e c h n o l o g y 32:191-198) から s c F v 遺伝子断片を増幅後、制限酵素 D r a I 及び B a m H I によって切り出した。p B l u e s c r i p t I I S K (+) の X b a I、B a m H I サイトに上記調製した2断片を挿入し、プラスミド p B l u e / s c F v を作製した。

2. p B l u e / s c F v から s c F v 遺伝子断片を制限酵素 N o t I 及び B a m H I によって切り出し、p C E P 4 の N o t I、B a m H I サイトへ挿入し、プラスミド p C E P 4 / s c F v を作製した。

20

3. ヒト I g G 1 産生ミエローマ細胞 I M - 9 から m R N A i s o l a t i o n K i t を用いて m R N A を取得し、得られた m R N A から R e v e r T r a A c e を用いて c D N A ライブラリを調製した。2つの化学合成オリゴヌクレオチド 5' - c a a g c t t c a a g g g c c c a t - 3' (配列番号 23) 及び 5' - a t t t a c c c g g a g a c a g g g a - 3' (配列番号 24) をプライマーとする P C R (95℃/2分→52℃/30秒→74℃/3分:30サイクル; P f u D N A ポリメラーゼ) により上記 c D N A ライブラリから h C γ 1 遺伝子断片を増幅した。さらに、2つの化学合成オリゴヌクレオチド 5' - a t t a g g a t c c g a g c c c a a a t c t t g t g a c a a a a c t c -

3' (配列番号 37 ; g g a t c c は B a m H I 制限酵素サイト) 及び 5' - a g c a a g c t t t c a t t t a c c c g g a g a c a g g g a - 3' (配列番号 26 ; a a g c t t は H i n d I I I 制限酵素サイト) をプライマーとする P C R (94℃/15秒→58℃/30秒→68℃/1分:30サイクル; KOD 5 - p l u s - D N A ポリメラーゼ) により上記 P C R 産物からヒト抗体 H 鎖 $\gamma 1$ の F c 領域 (F c) の遺伝子断片を増幅後、制限酵素 B a m H I 及び H i n d I I I によって切り出し、p B l u e s c r i p t I I S K (+) の B a m H I、H i n d I I I サイトへ挿入し、プラスミド p B l u e / F c を作製した。

10 4. p C E P 4 / s c F v から s c F v 遺伝子断片を制限酵素 H i n d I I I 及び B a m H I によって切り出した。p B l u e / F c から F c 遺伝子断片を制限酵素 B a m H I 及び H i n d I I I によって切り出した。p B l u e s c r i p t I I S K (+) の H i n d I I I サイトへ上記切り出した 2 断片を挿入し、プラスミド p B l u e / s c F v - F c を作製した。

15

5. p B l u e / s c F v - F c からニワトリ一本鎖抗体可変領域にヒト抗体 H 鎖 $\gamma 1$ ・F c が連結した構造 (s c F v - F c) の遺伝子断片を制限酵素 H i n d I I I によって切り出し、制限酵素 H i n d I I I によって処理した p M S C V / G Δ A H のベクター断片に連結した。 Δ A c t プロモーターと同方向に s c F v - F c 遺伝子が連結された構造のプラスミドを p M S C V / G Δ A s c F v - F c とした。

20

このように作製した複製能欠失型レトロウイルスベクターのベクターコンストラクト p M S C V / G Δ A s c F v - F c の構造を図 13 に示した。

25 (実施例 13) s c F v - F c 抗体発現 G O トランスジェニックキメラウズラの作製

実施例 2 に準じて、ベクターコンストラクト p M S C V / G Δ A s c F v - F c よりレトロウイルスベクターを調製した。このレトロウイルスベクターのタイターを測定したところ、 10^8 c f u / m l ~ 10^9 c f u / m l だった。

得られたウイルスベクター溶液を、実施例 3 に準じて孵卵後 36 時間のウズラ受精卵心臓にマイクロインジェクションし、実施例 10 に準じて孵化させることにより G0 トランスジェニックキメラウズラを誕生させた。

5 (実施例 14) 血清中、卵中の s c F v - F c 濃度の測定

実施例 13 により誕生した G0 トランスジェニックキメラウズラを 1 ヶ月間飼育して雛を成長させた。30 日後および 60 日後、成長した G0 トランスジェニックキメラウズラ (個体識別番号 # 3303、# 3306、# 3310、# 3311、# 3313) の翼下静脈より採血を行い、血液サンプルを得た。得られた
10 血液を 15,000 rpm で 10 分間遠心し、上清として得られる血清から s c F v - F c 抗体量の測定を行った。

孵化から 1.5 ヶ月後、産卵を始めた雌性トランスジェニックウズラ (個体識別番号 # 3310) より採卵を行い、実施例 7 に準じて調製した卵白、卵黄中の s c F v - F c 抗体量を、実施例 8 に準じて ELISA 法により定量した。

15 標準検量線は精製した s c F v - F c を用いて作製した。実施例 12 で作製したベクターコンストラクト pMSCV / s c F v - F c をリポフェクション法により GP293 細胞に導入し、その培養上清を 4℃、10 分間、3000 rpm で遠心して固形物を除去した。この上清を冷却しながら攪拌し、50% 飽和となるよう細かく砕いた硫酸アンモニウムを徐々に加え (313 g 硫酸 / 1000 ml
20 水)、タンパク質を沈殿させた。これを 4℃ で一晩静置した後、4℃ で 10 分間、15,000 rpm で遠心して沈殿を完全に沈降させ、少量の PBS で溶解した。2 L の PBS で 3 回透析して硫酸を除去した。

精製用のプロテイン G カラム (パーゼプティブバイオシステムズ社製) の初期洗浄を Binding Buffer ($\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.56 g /
25 1、 $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 7.16 g / 1) 10 mL、Wash Buffer (酢酸 20%、蒸留水 80%) 10 ml、Binding Buffer 10 ml の順で行った (流速 2 ml / 分)。PBS に溶解したタンパク質液を 1 ml / 分で流し、s c F v - F c をカラムに吸着させた。Binding Buffer 20 ml を 1.7 ml / 分で流して、不要なタンパク質を除去し、E

l u t i o n B u f f e r (グ リ シ ン 7 . 5 0 7 g / l 、 2 N H C l に て
p H 2 . 5 ~ 3 . 0 に 調 製) を 1 . 5 m l / 分 で 流 し て 、 s c F v - F c を 溶 出
し た。

溶出分画をPBS (2 L) で3回透析し、精製scFv-Fcとし、波長28
5 0 n m の 吸 光 度 より タ ン パ ク 質 濃 度 を 定 量 し た。

実施例14で作製したG0トランスジェニックキメラウズラの30日後、60
日 後 採 血 血 清 中 の s c F v - F c 量 を 図 1 4 に 示 し た 。 s c F v - F c 抗 体 の 発
現 遺 伝 子 を 導 入 さ れ た G 0 ト ラ ン ス ジ ェ ニ ッ ク キ メ ラ ウ ズ ラ は 、 3 0 日 目 に 約 2
m g / m l ~ 4 m g / m l の 抗 体 を 血 清 中 に 発 現 し 、 5 羽 の う ち 3 羽 が 6 0 日 後
10 も 同 程 度 の 発 現 量 を 示 し た。

G0トランスジェニックキメラウズラ (#3310) が産卵を始めた日から、
卵黄、卵白中のscFv-Fc量を図15に示した。抗体は卵白、卵黄中に約5
0 0 μ g / m l ~ 1 m g / m l 発 現 し 、 産 卵 開 始 か ら 1 7 日 目 ま で 若 干 の 変 動 は
あ る も の の 安 定 し た 発 現 量 を 維 持 し た。

15

(実施例15) scFv-Fc構造の確認

実施例13で作製したG0トランスジェニックキメラウズラ血清1mlから実
施 例 1 0 に 準 じ て 、 硫 安 沈 殿 と プ ロ テ イ ン G カ ラ ム に よ り s c F v - F c を 精 製
し た 。 精 製 し た s c F v - F c を S D S - P A G E で 解 析 し 、 そ の 結 果 を 図 1 6
20 に 示 し た 。 未 処 理 の レ ー ン よ り 、 s c F v - F c の 分 子 量 約 1 2 0 k D a が 示 さ
れ た 。 還 元 処 理 し た s c F v - F c の 分 子 量 は 未 処 理 の 場 合 の ほ ぼ 半 分 (約 6 0
k D a) に な っ て い る こ と か ら 、 G 0 ト ラ ン ス ジ ェ ニ ッ ク キ メ ラ ウ ズ ラ に よ り 産
生 さ れ た s c F v - F c は S - S 結 合 に よ る 2 量 体 を 形 成 し て い る こ と が わ か っ
た 。 こ れ ら は 、 S - S 結 合 に 関 与 す る シ ス テ イ ン 残 基 を F c 部 に 有 す る s c F v
25 - F c の 構 造 的 特 徴 に 符 合 し 、 G 0 ト ラ ン ス ジ ェ ニ ッ ク キ メ ラ ウ ズ ラ に よ り 産 生
さ れ た s c F v - F c は 正 し い 構 造 を 保 持 し て い る こ と が 示 唆 さ れ た。

(実施例16) TNFR-Fc融合タンパク発現G0トランスジェニックキメラ
ニワトリの作製

実施例 9 に準じて TNFR-Fc 発現ベクターコンストラクトを作製し、実施例 2 に準じてレトロウイルスベクターを作製した。このレトロウイルスベクターのタイターは、 $1.7 \times 10^7 \text{ cfu/ml}$ だった。

5 得られたウイルスベクター溶液を、実施例 4 に準じて孵卵後 55 時間のニワトリ受精卵心臓にマイクロインジェクションし、実施例 10 に準じて孵化させることにより G0 トランスジェニックキメラニワトリを誕生させた。

8 個の受精卵にインジェクションしたところ 4 羽が孵化し、実施例 14 に準じてその血清中の TNFR-Fc を定量したところ、最高で $50 \mu\text{g/ml}$ の TNFR-Fc が発現していた。

10

産業上利用の可能性

本発明の G0 トランスジェニックキメラ鳥類は、複製能欠失型レトロウイルスベクターで導入された遺伝子を不活性化することなく効率的に発現することができる。また、本発明の G0 トランスジェニックキメラ鳥類の作製法は、キメラ抗体、例えば scFv-Fc 抗体の遺伝子を導入し、血中、卵中に抗体を効率的に
15 発現することができる鳥類の作製を可能にする。更に、本発明の抗体生産法は、キメラ抗体、例えば scFv-Fc 抗体を産生する G0 トランスジェニックキメラ鳥類を作製し、抗体を鳥類の血清、卵中から回収、精製することからなるので、効率よい抗体生産を可能にする。

20

請求の範囲

1. 複製能欠失型レトロウイルスベクターによって外来性抗体遺伝子が導入されたG 0トランスジェニックキメラ鳥類であって、導入遺伝子に由来する抗体を、
5 血中、卵白中及び卵黄中の少なくとも1つに産生することを特徴とするG 0トランスジェニックキメラ鳥類。

2. 抗体の定常領域のクラスがヒト I g Gである請求の範囲第1項記載のG 0トランスジェニックキメラ鳥類。

10

3. 抗体の定常領域のサブクラスがヒト I g G 1である請求の範囲第1項記載のG 0トランスジェニックキメラ鳥類。

4. 抗体の定常領域がウズラ I g G、ニワトリ I g G、あるいはマウス I g G
15 である請求の範囲第1項記載のG 0トランスジェニックキメラ鳥類。

5. 抗体遺伝子が構成的なプロモーターにより制御されている請求の範囲第1～4項のいずれか1項記載のG 0トランスジェニックキメラ鳥類。

20 6. 構成的なプロモーターがニワトリ β -アクチンプロモーターである請求の範囲第5項記載のG 0トランスジェニックキメラ鳥類。

7. レトロウイルスベクターがモロニー・ミューリン・ロイケミア・ウイルス由来ベクターである請求の範囲第1～6項のいずれか1項記載のG 0トランスジェニックキメラ鳥類。
25

8. レトロウイルスベクターがVSV-Gシュードタイプである請求の範囲第1～7項のいずれか1項記載のG 0トランスジェニックキメラ鳥類。

9. 鳥類がニワトリあるいはウズラである請求の範囲第1～8項のいずれか1項記載のG 0 トランスジェニックキメラ鳥類。
10. 抗体がキメラ抗体である請求の範囲第1～9項のいずれか1項記載のG
5 0 トランスジェニックキメラ鳥類。
11. 血液中に抗体を $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上含む請求の範囲第10項記載のG
0 トランスジェニックキメラ鳥類。
- 10 12. 血液中に抗体を $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上含む請求の範囲第11項記載のG 0 ト
ランスジェニックキメラ鳥類。
13. 卵白中に抗体を $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上含む請求の範囲第10項記載のG
0 トランスジェニックキメラ鳥類。
15
14. 卵白中に抗体を $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上含む請求の範囲第13項記載のG 0 ト
ランスジェニックキメラ鳥類。
15. 卵黄中に抗体を $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上含む請求の範囲第10項記載のG
20 0 トランスジェニックキメラ鳥類。
16. 卵黄中に抗体を $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上含む請求の範囲第15項記載のG 0 ト
ランスジェニックキメラ鳥類。
- 25 17. 抗体がs c F v－F c抗体である請求の範囲第1～9項のいずれか1項
記載のG 0 トランスジェニックキメラ鳥類。
18. 血液中に抗体を $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上含む請求の範囲第17項記載のG 0
トランスジェニックキメラ鳥類。

19. 血液中に抗体を $2000 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上含む請求の範囲第18項載のG0トランスジェニックキメラ鳥類。

5 20. 卵白中に抗体を $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上含む請求の範囲第17項記載のG0トランスジェニックキメラ鳥類。

21. 卵白中に抗体を $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上含む請求の範囲第20項記載のG0トランスジェニックキメラ鳥類。

10

22. 卵黄中に抗体を $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上含む請求の範囲第17項記載のG0トランスジェニックキメラ鳥類。

15

23. 卵黄中に抗体を $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上含む請求の範囲第22項記載のG0トランスジェニックキメラ鳥類。

24. 請求の範囲第1～23項のいずれか1項記載のG0トランスジェニックキメラ鳥類を作製し、前記G0トランスジェニックキメラ鳥類の血中及び／又は卵中から抗体を回収することを特徴とする抗体の生産法。

20

25. 鳥類受精卵を孵卵し、放卵直後の胚盤葉期を除くそれ以降の初期胚へ複製能欠失型レトロウイルスベクターを感染させ、その胚を孵化させることからなるG0トランスジェニックキメラ鳥類の作製法。

25 26. 鳥類受精卵を孵卵し、孵卵開始から24時間以降の初期胚へ複製能欠失型レトロウイルスベクターを感染させ、その胚を孵化させることからなる請求の範囲第25項記載のG0トランスジェニックキメラ鳥類の作製法。

27. 鳥類受精卵を孵卵し、その初期胚に形成される心臓ないしは血管内へ複

製能欠失型レトロウイルスベクターをマイクロインジェクションすることを特徴とする請求の範囲第25又は26項記載のG0トランスジェニックキメラ鳥類の作製法。

- 5 28. 鳥類受精卵を孵卵し、孵卵開始から24時間以降の初期胚に形成される心臓ないしは血管内へ複製能欠失型レトロウイルスベクターをマイクロインジェクションすることを特徴とする請求の範囲第25又は26項記載のG0トランスジェニックキメラ鳥類の作製法。

- 10 29. 1×10^7 cfu/ml以上のタイターを持つ複製能欠失型レトロウイルスベクターをマイクロインジェクションすることを特徴とする請求の範囲第25～28項のいずれか1項記載のG0トランスジェニックキメラ鳥類の作製法。

- 15 30. 1×10^8 cfu/ml以上のタイターを持つ複製能欠失型レトロウイルスベクターをマイクロインジェクションすることを特徴とする請求の範囲第29項記載のG0トランスジェニックキメラ鳥類の作製法。

- 20 31. 1×10^9 cfu/ml以上のタイターを持つ複製能欠失型レトロウイルスベクターをマイクロインジェクションすることを特徴とする請求の範囲第30項記載のG0トランスジェニックキメラ鳥類の作製法。

32. レトロウイルスベクターがモロニー・ミューリン・ロイケミア・ウイルス由来ベクターであることを特徴とする請求の範囲第25～31項のいずれか1項記載のG0トランスジェニックキメラ鳥類の作製法。

25

33. レトロウイルスベクターがVSV-Gシュードタイプであることを特徴とする請求の範囲第25～32項のいずれか1項記載のG0トランスジェニックキメラ鳥類の作製法。

34. 鳥類がニワトリまたはウズラである請求の範囲第25～33項のいずれか1項記載のG0トランスジェニックキメラ鳥類の作製法。

35. レトロウイルスに由来しない遺伝子配列が、複製能欠失型レトロウイルスベクターに組み込まれる導入遺伝子に含有される請求の範囲第25～34項のいずれか1項記載のG0トランスジェニックキメラ鳥類の作製法。

36. レトロウイルスに由来しない遺伝子配列は、ニワトリ β -アクチンプロモーターにより制御されている遺伝子配列である請求の範囲第35項記載のG0トランスジェニックキメラ鳥類の作製法。

37. レトロウイルスに由来しない遺伝子配列は、抗体遺伝子をコードする遺伝子配列である請求の範囲第35又は36項記載のG0トランスジェニックキメラ鳥類の作製法。

15

38. 抗体遺伝子がキメラ抗体遺伝子である請求の範囲第37項記載のG0トランスジェニックキメラ鳥類の作製法。

39. 抗体遺伝子がs c F v - F c抗体遺伝子である請求の範囲第37項記載のG0トランスジェニックキメラ鳥類の作製法。

20

40. レトロウイルスに由来しない遺伝子配列は、融合タンパク遺伝子をコードする遺伝子配列である請求の範囲第35又は36項記載のG0トランスジェニックキメラ鳥類の作製法。

25

41. 請求の範囲第25～40項のいずれか1項記載の方法で作製されたG0トランスジェニックキメラ鳥類。

1 / 14

図 1

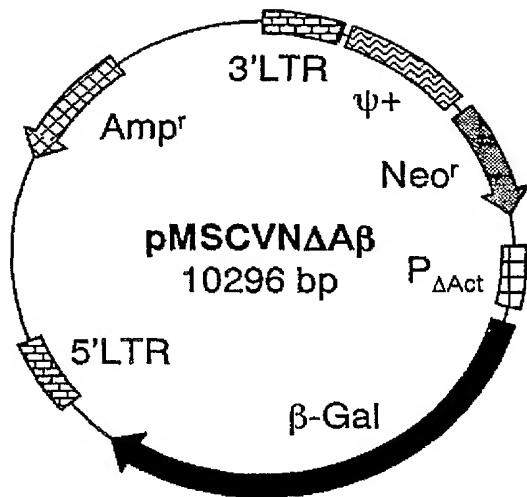
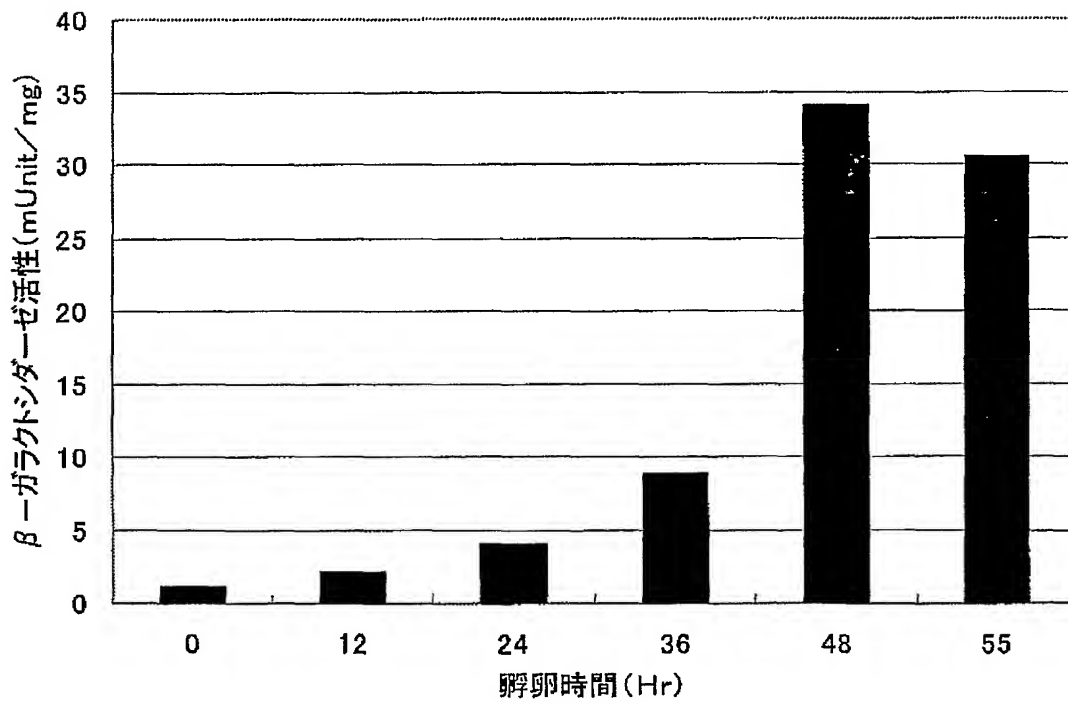


図 2



2 / 14

図 3

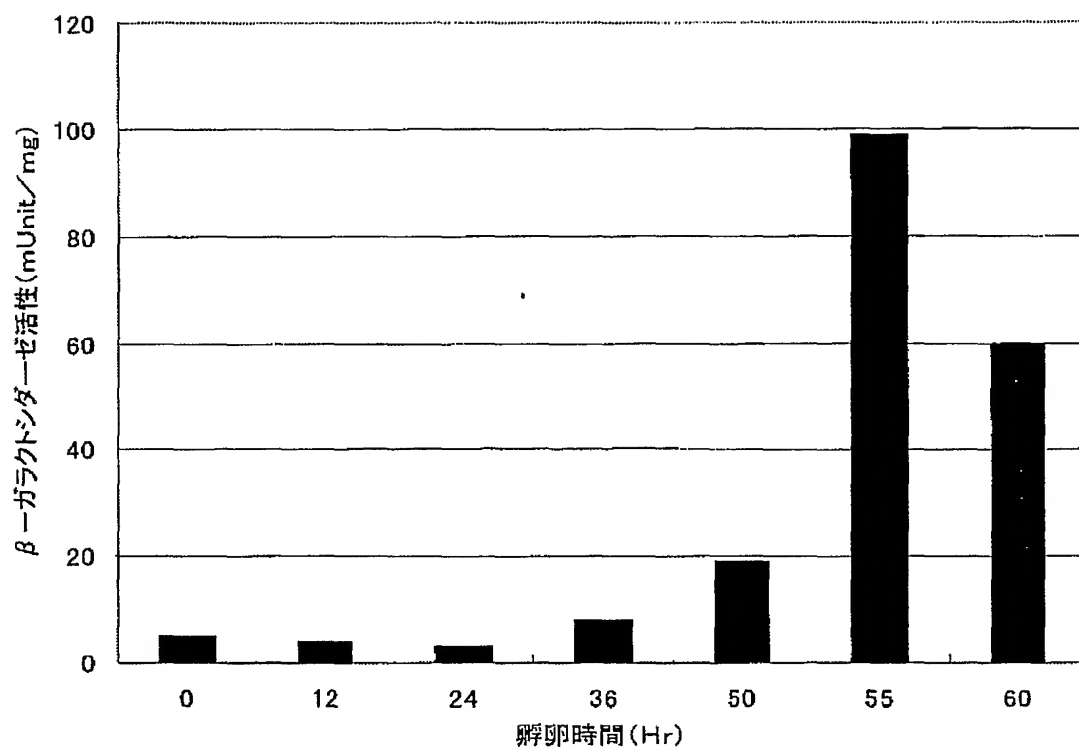
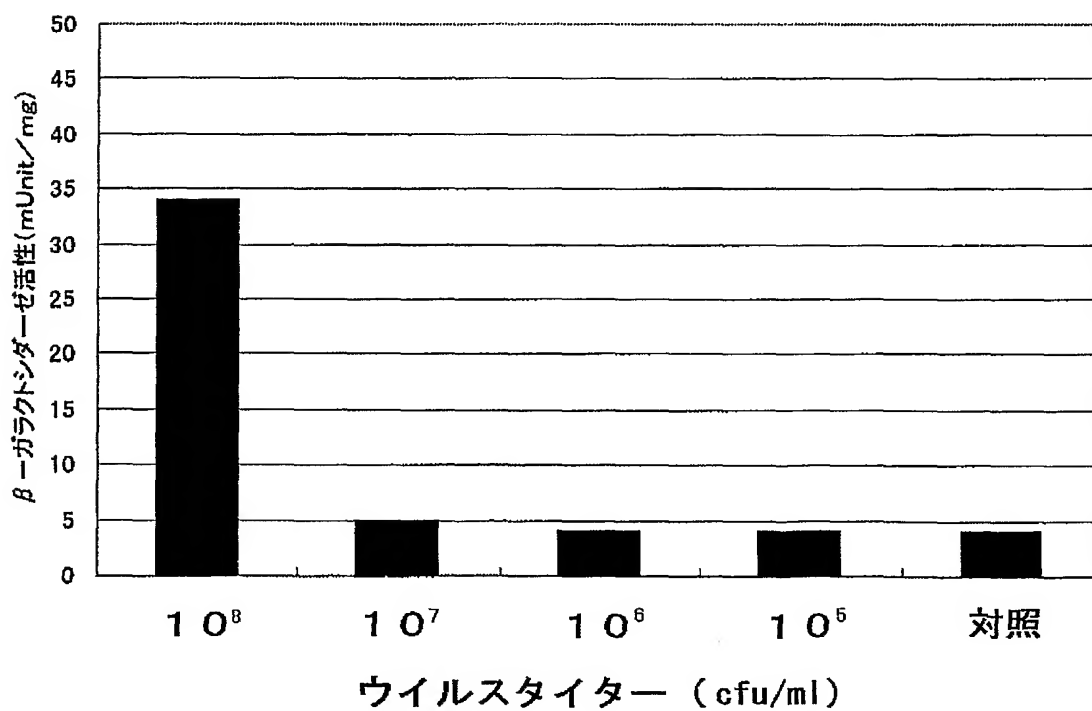


図 4



3 / 14

図 5

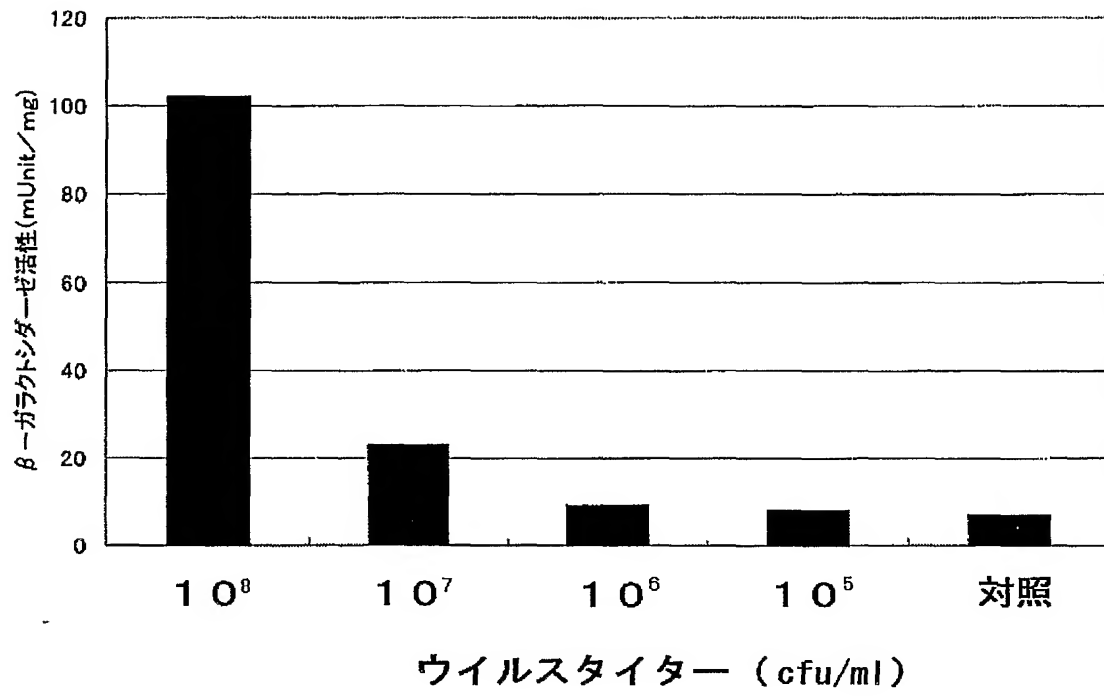


図 6

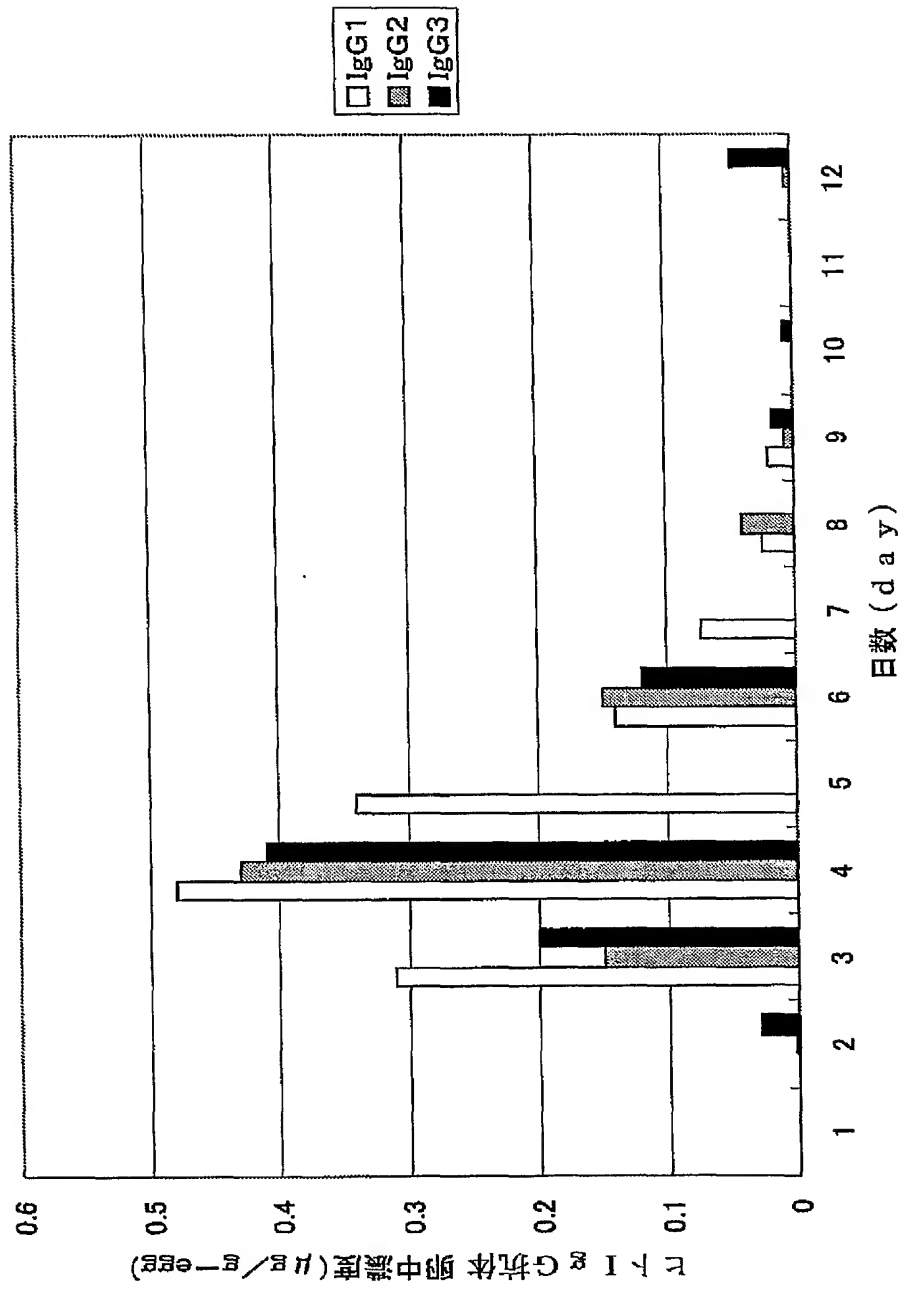
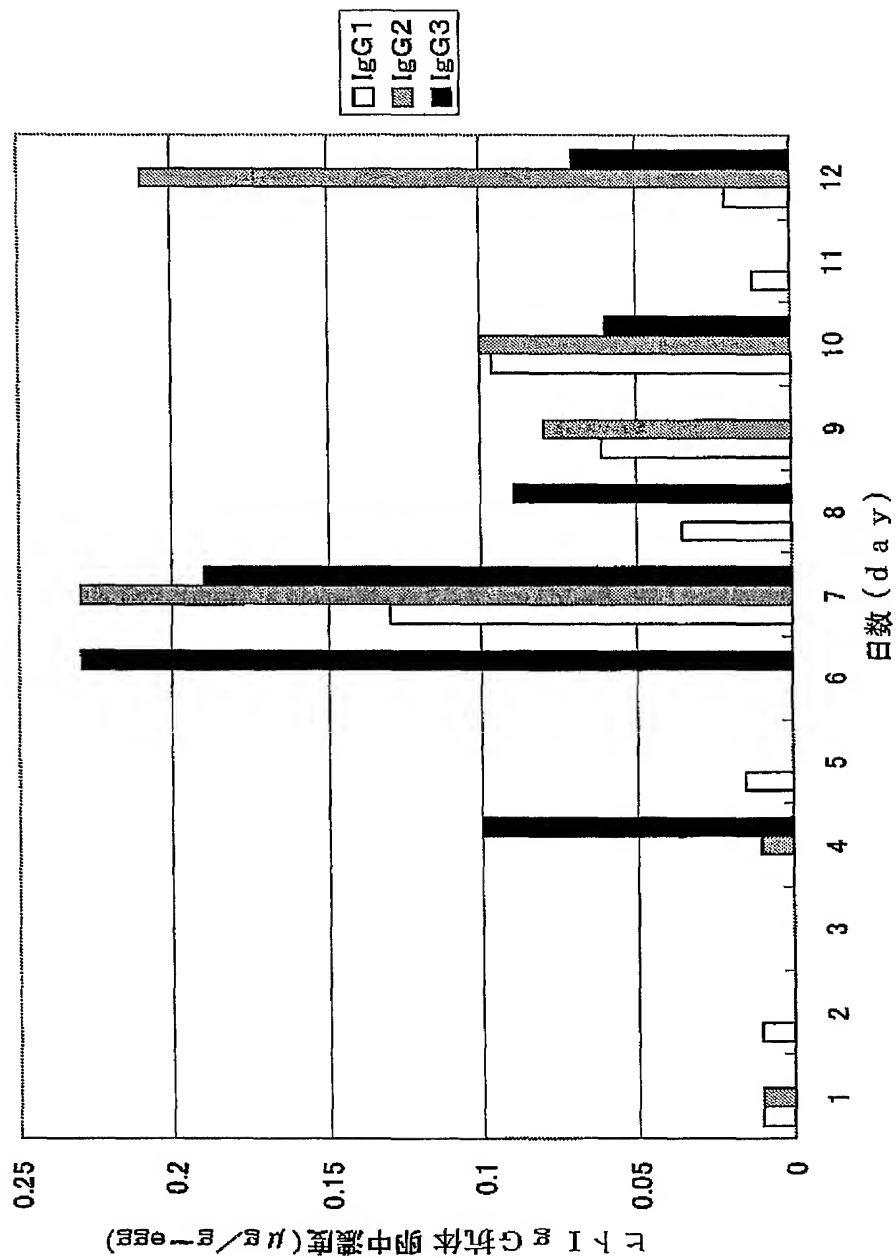


図 7



6 / 14

図 8

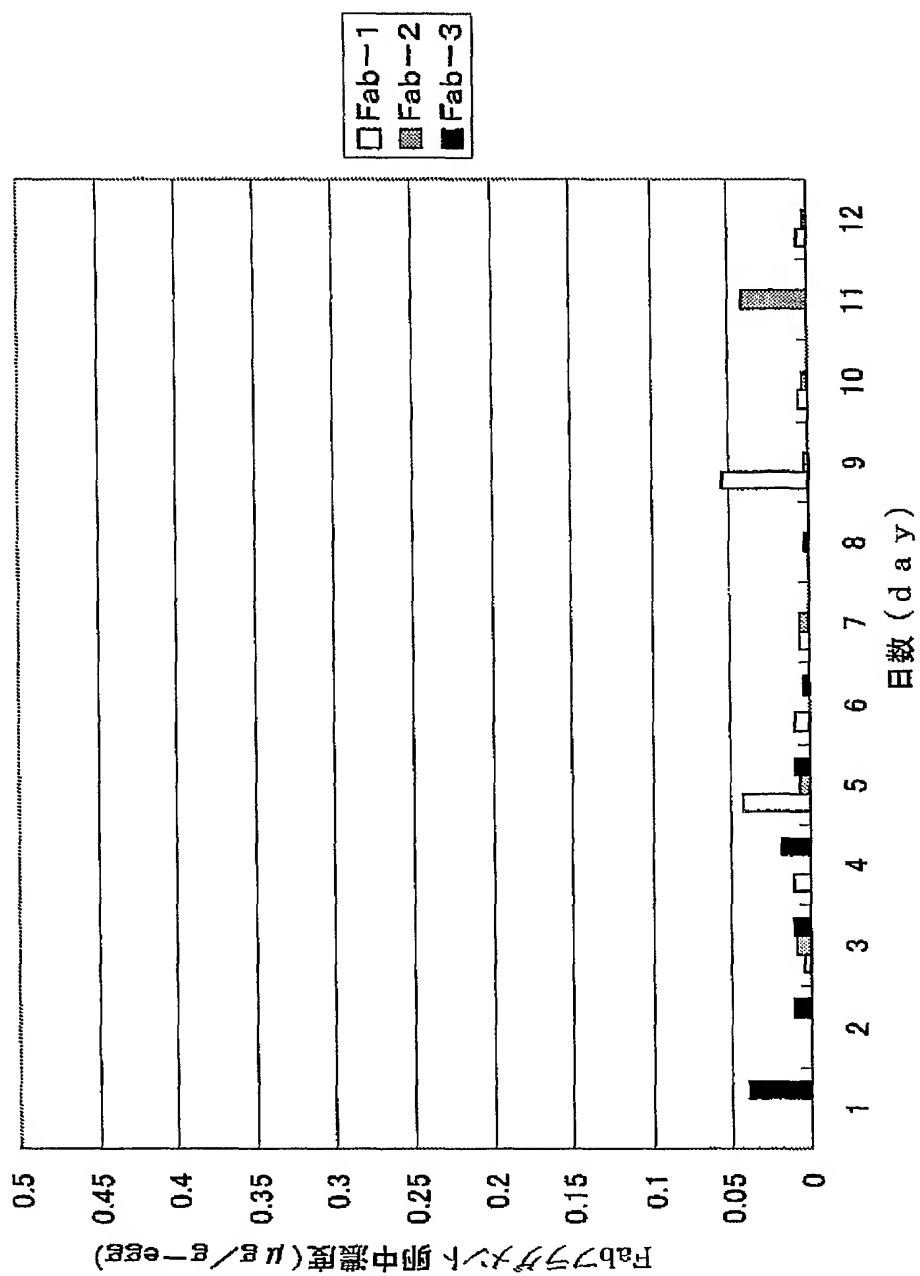


図 9

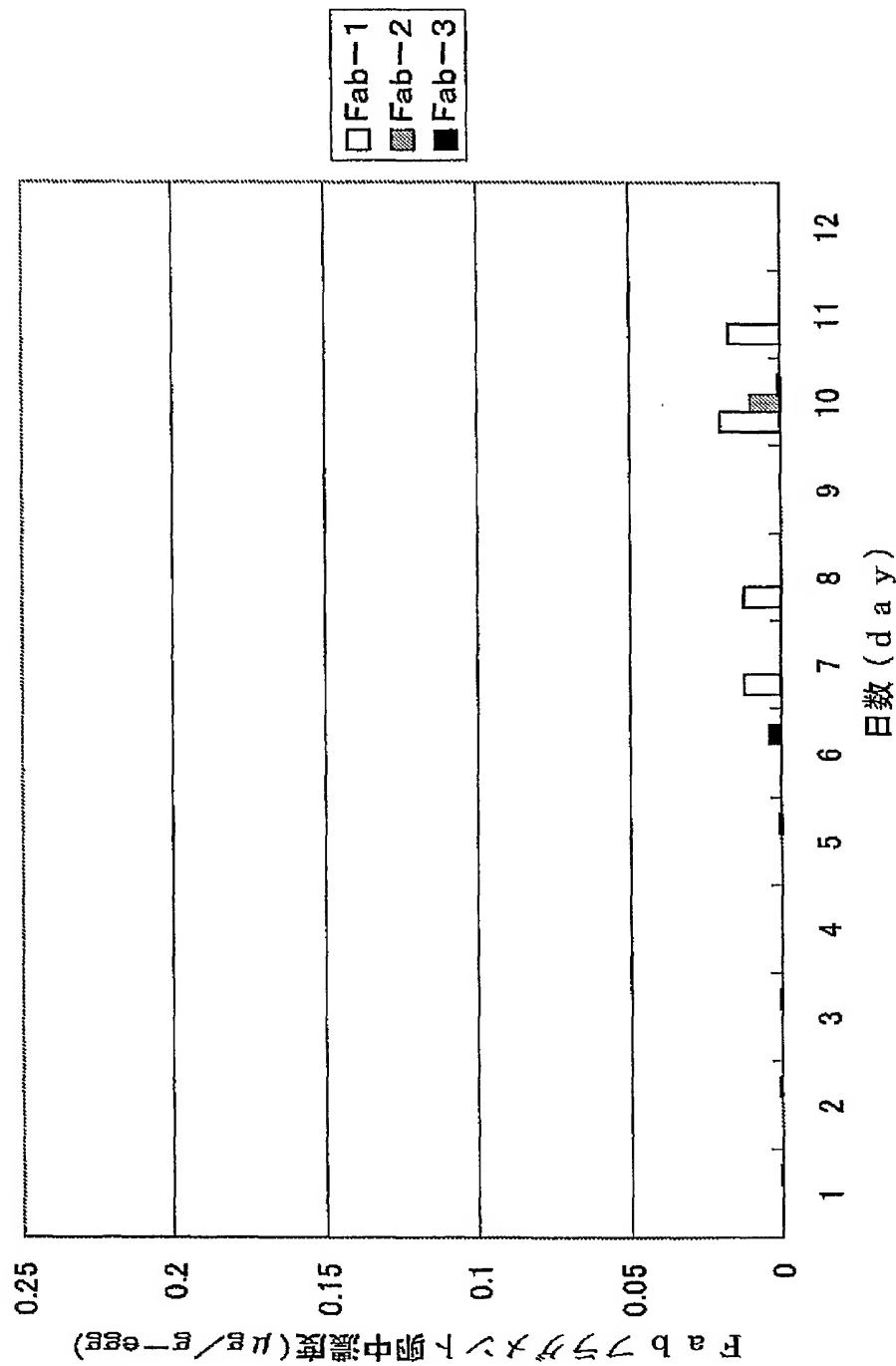


図 10

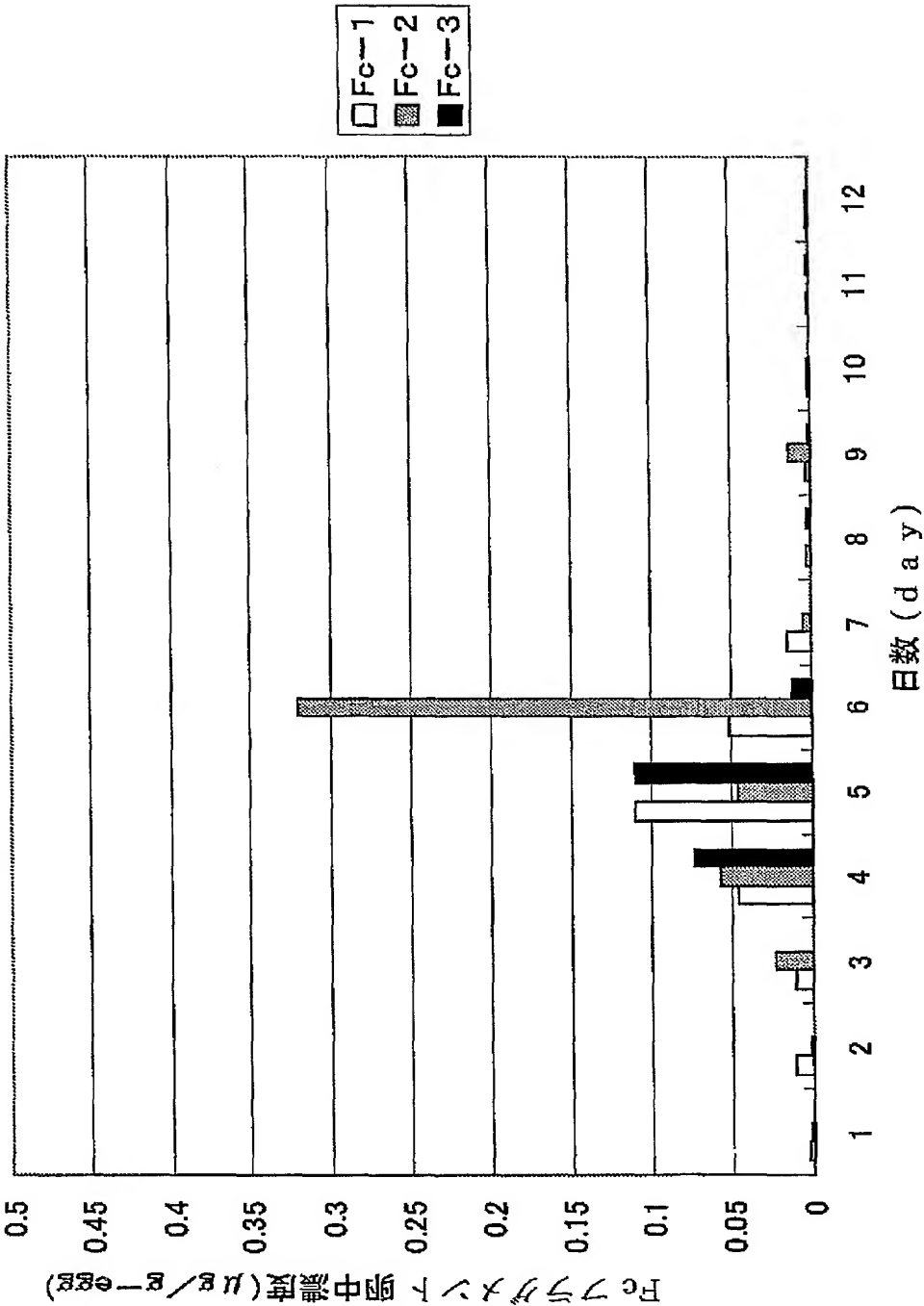
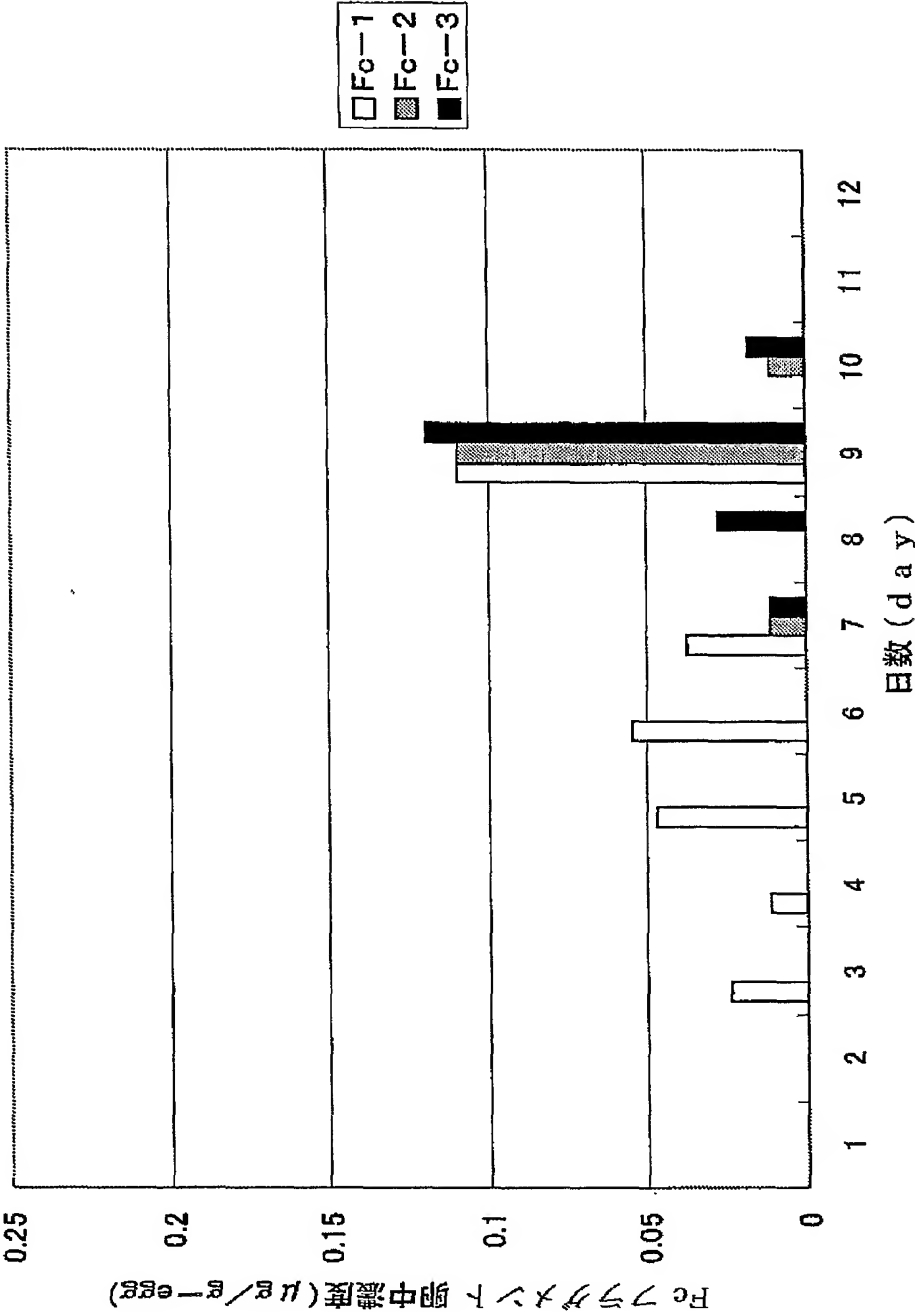


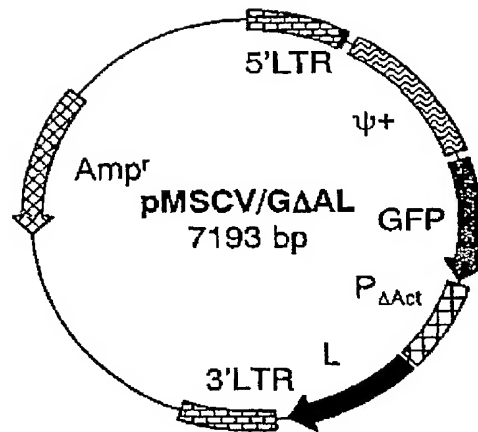
図 1 1



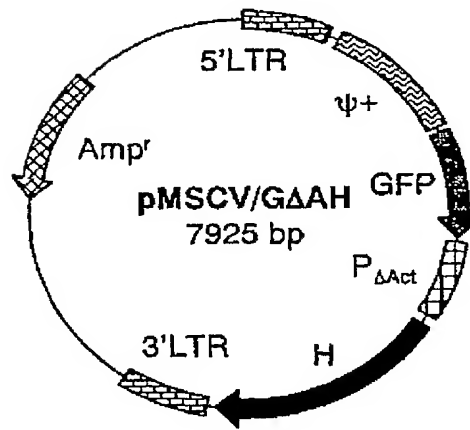
10 / 14

図 1 2

(A)



(B)



(C)

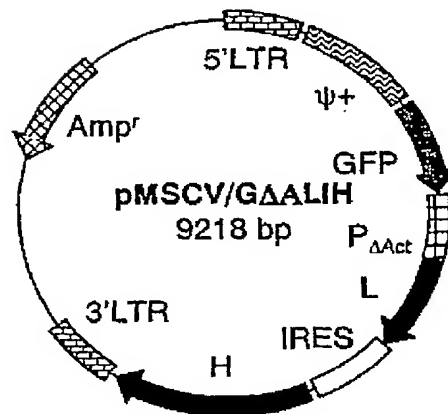


図 1 3

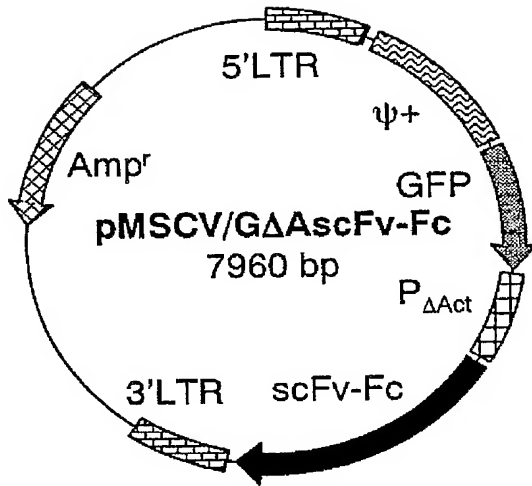
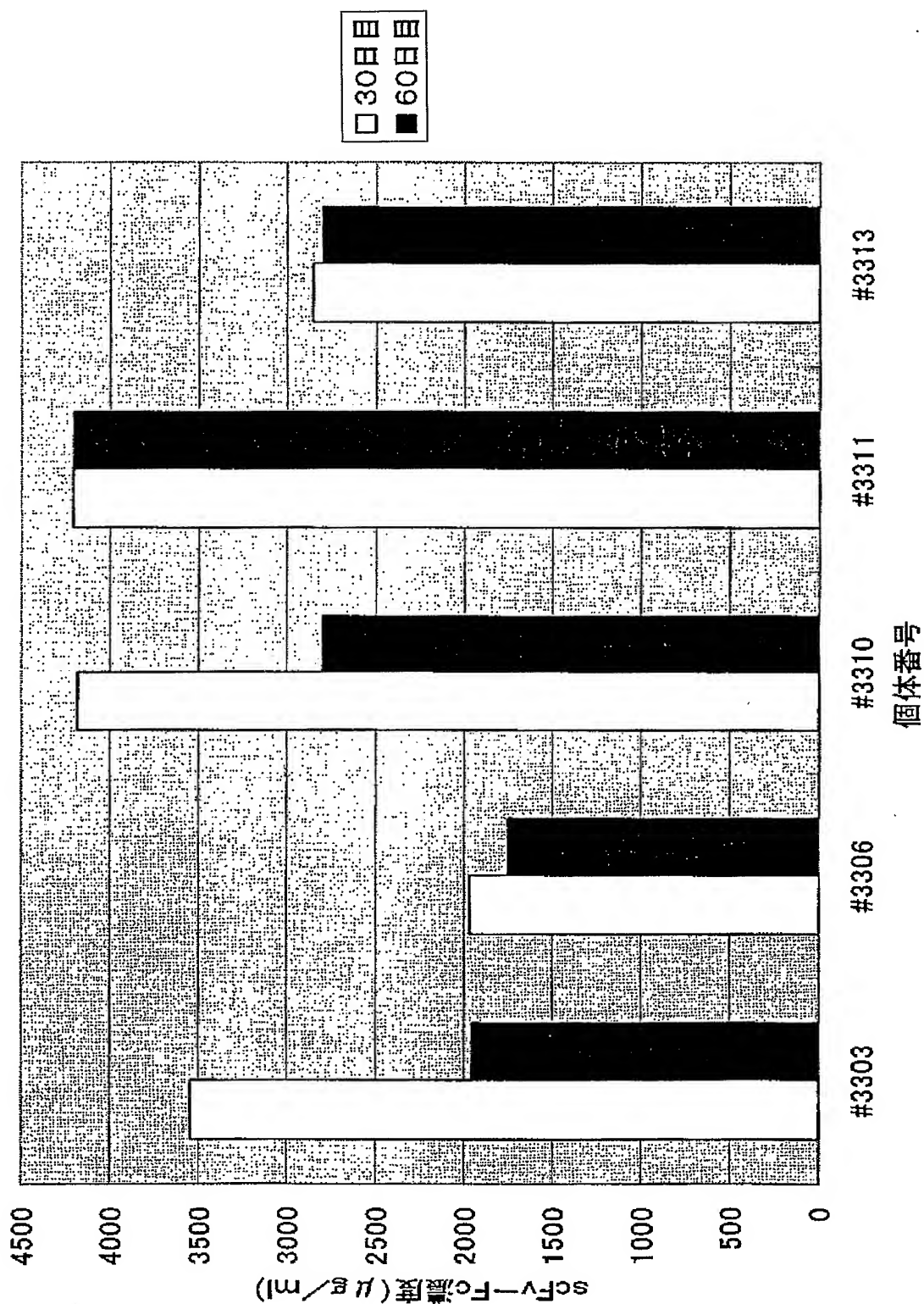
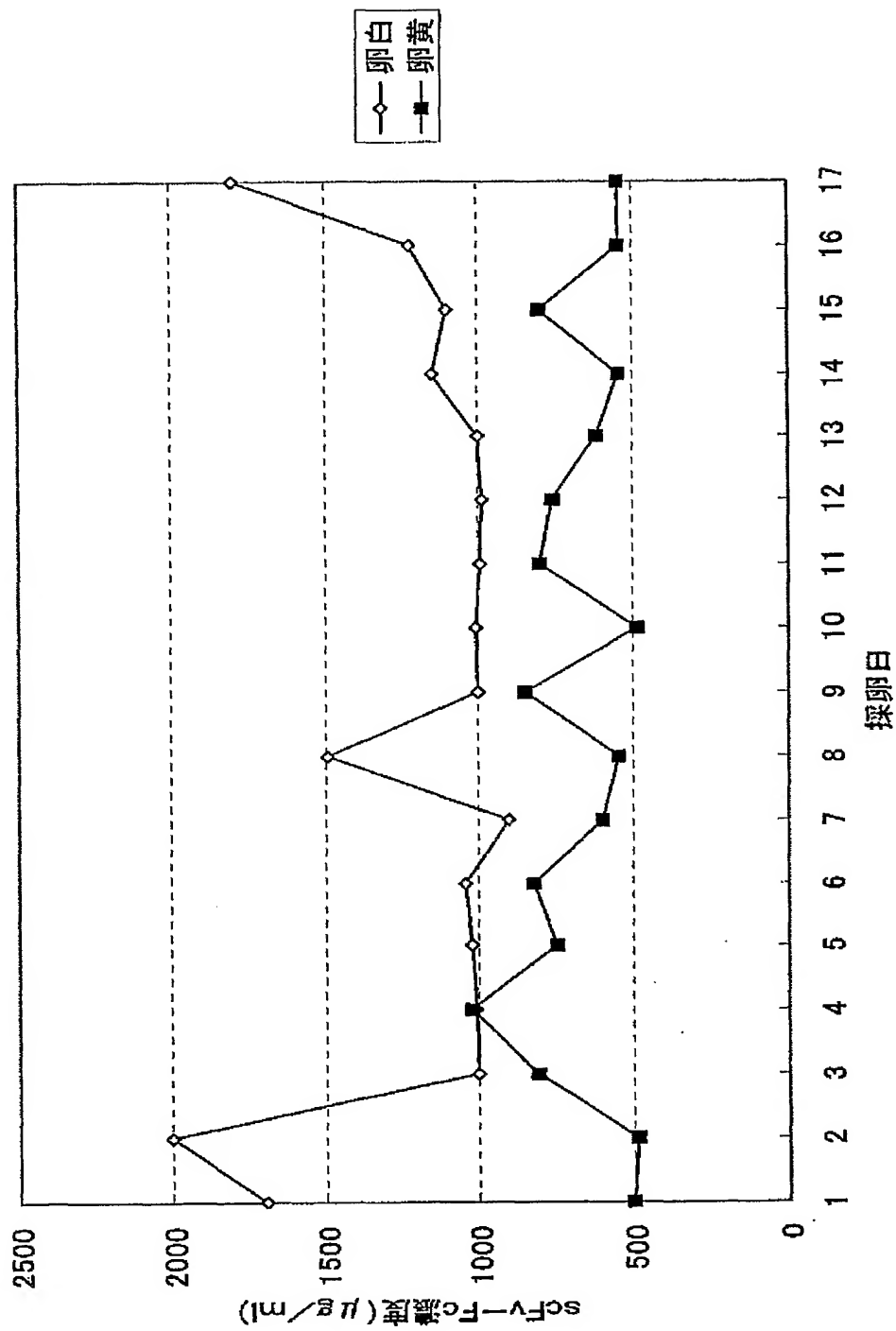


図 1 4



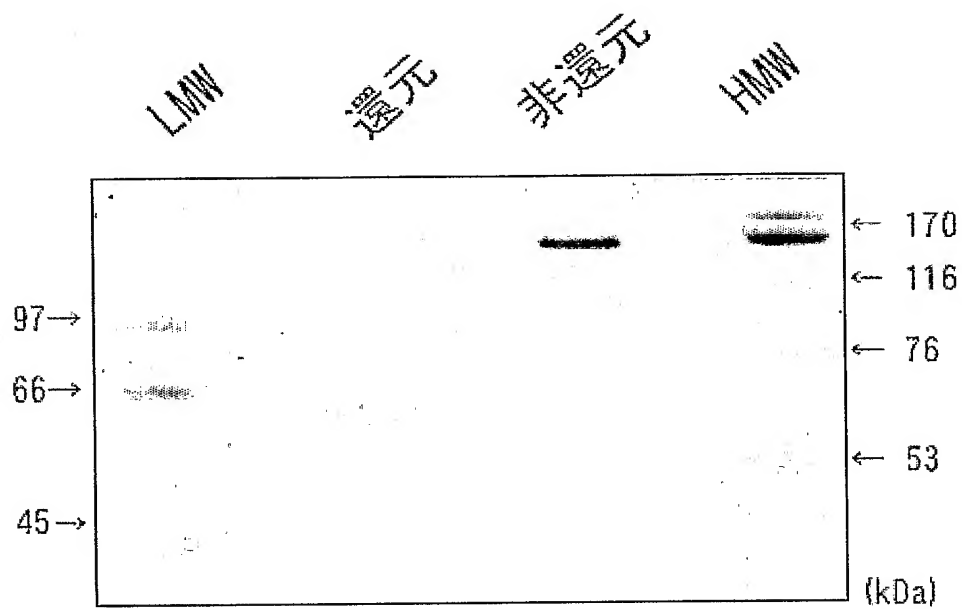
13 / 14

図 15



14 / 14 .

図 1 6



SEQUENCE LISTING

<110> Kaneka Corporation,
Nagoya Industrial Science Research Institute (Chubu Technology
Licensing Office)

<120> Method of gene expression in transgenic birds transformed with retrovirus
vectors and transgenic birds thus obtained

<130> T753/TRANS-1

<150> JP P2002-236089

<151> 2002-08-13

<160> 37

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of a 5'-primer used for PCR amplification of the
Miw promoter 5' region fragment

<400> 1

cggctctagag gaattcagtg gttcg 25

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of a 3'-primer incorporating the BamH I recognition

2/15

site at the 5' terminal used for PCR amplification of the Miw promoter 5' region fragment

<400> 2

ccaggatccg acgttgtaaa acgacg 26

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of a 5'-primer incorporating the Hind III recognition site at the 5' terminal used for PCR amplification of the Miw promoter 3' region fragment

<400> 3

ccaaagcttg ccgcagccat tgcctttt 28

<210> 4

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of a 3'-primer incorporating the Bln I recognition site at the 5' terminal used for PCR amplification of the Miw promoter 3' region fragment

<400> 4

atacctaggg gctggctgcg gaggaac 27

<210> 5

3/15

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of a 5' -primer incorporating the Nhe I recognition site at the 5' terminal used for PCR amplification of the chicken β -actin promoter fragment lacking the intron

<400> 5

tttagctagc tgcagctcag tgcattgcac 29

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of a 3' -primer incorporating the Xba I recognition site at the 5' terminal used for PCR amplification of the chicken β -actin promoter fragment lacking the intron

<400> 6

ataatctaga aacgcagcga ctccccgc 27

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of a 5' -primer incorporating the Xho I recognition site at the 5' terminal used for PCR amplification of the coding fragment of the human antibody light chain κ constant region

4/15

<400> 7

atcctcgaga ggccaaagta cagtg 25

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of a 3'-primer incorporating the BamH I recognition site at the 5' terminal used for PCR amplification of the coding fragment of the human antibody light chain κ constant region

<400> 8

cccgatccc taacactctc ccctgttgaa gct 33

<210> 9

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of a 5'-primer incorporating the Not I recognition site at the 5' terminal used for PCR amplification of the coding fragment of the human antibody light chain variable region

<400> 9

agcggccgct acaggtgtcc actccgacat cgtgatgacc cagtctcc 48

<210> 10

<211> 34

<212> DNA

5/15

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of a 3'-primer incorporating the Xho I recognition site at the 5' terminal used for PCR amplification of the coding fragment of the human antibody light chain variable region

<400> 10

cctctcgagg atagaagtta ttcagcaggc acac 34

<210> 11

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of a 5'-primer incorporating the Xho I recognition site at the 5' terminal used for PCR amplification of the coding fragment of the human antibody heavy chain μ constant region

<400> 11

acctcgagcg tggccgttgg ctgcctcgca ca 32

<210> 12

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of a 3'-primer incorporating the Hind III recognition site at the 5' terminal used for PCR amplification of the coding fragment of the human antibody heavy chain μ constant region

<400> 12

6/15

actaagctta cgttgtacag ggtgggttta cc 32

<210> 13

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of a 5'-primer incorporating the Not I recognition site at the 5' terminal used for PCR amplification of the coding fragment of the human antibody heavy chain variable region

<400> 13

agcggccgct acaggtgtcc actccgaggt gcagctgggtg gagtctgg 48

<210> 14

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of a 3'-primer incorporating the Xho I recognition site at the 5' terminal used for PCR amplification of the coding fragment of the human antibody heavy chain variable region

<400> 14

cacgctcgag gtatccgacg gggaattctc acagga 36

<210> 15

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

7/15

<220>

<223> Designed sequence of a 5'-primer incorporating the Hind III recognition site at the 5' terminal used for DNA polymerase reaction to construct the coding fragment of the human epidermal growth factor receptor transmembrane region

<400> 15

cccaagcttg atctccactg ggatggtggg ggcctcctc ttgctgctg 49

<210> 16

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of a 3'-primer incorporating the BamH I recognition site at the 5' terminal used for DNA polymerase reaction to construct the coding fragment of the human epidermal growth factor receptor transmembrane region

<400> 16

cccggatcct cagtcaaggc gccttcgcat gaagaggccg atccccaggg ccaccaccag 60
cagcaagagg agggcccc 78

<210> 17

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide used for site-directed mutagenesis to generate the Nar I recognition site at the 3' terminal of the coding fragment of the human antibody light chain variable region

8/15

<400> 17

tgaagacaga tggcgccgcc acagttcggt t 31

<210> 18

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide used for site-directed mutagenesis to generate the BamH I recognition site at the 3' terminal of the coding fragment of the human antibody heavy chain variable region

<400> 18

tggggcggtat gcggatcctg aggagacggt 30

<210> 19

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of a 5'-primer incorporating the Not I recognition site at the 5' terminal used for PCR amplification of the coding fragment of the mouse antibody light chain variable region

<400> 19

cgcgccgcc tcagggaag tttgaagatg 30

<210> 20

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

9/15

<220>

<223> Designed sequence of a 3'-primer incorporating the Nar I recognition site at the 5' terminal used for PCR amplification of the coding fragment of the mouse antibody light chain variable region

<400> 20

cgggcgccgcc acagtccgtt ttatttccag cttggt 36

<210> 21

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of a 5'-primer incorporating the Not I recognition site at the 5' terminal used for PCR amplification of the coding fragment of the mouse antibody heavy chain variable region

<400> 21

cgcggcgcg aacacggamc cctcaccatg 30

<210> 22

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of a 3'-primer incorporating the BamH I recognition site at the 5' terminal used for PCR amplification of the coding fragment of the mouse antibody heavy chain variable region

<400> 22

cggatcctgc agagacagtg accagagt 28

10/15

<210> 23

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of a 5'-primer used for PCR amplification of the coding fragment of the human antibody heavy chain γ 1 constant region

<400> 23

caagcttcaa gggcccat 18

<210> 24

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of a 3'-primer used for PCR amplification of the coding fragment of the human antibody heavy chain γ 1 constant region

<400> 24

atttaccgga agacaggga 19

<210> 25

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of a 5'-primer incorporating the BamH I recognition site at the 5' terminal used for PCR amplification of the coding fragment

11/15

of the human antibody heavy chain $\gamma 1$ constant region

<400> 25

ataggatccg ctagcttcaa gggcccatcg 30

<210> 26

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of a 3'-primer incorporating the Hind III recognition site at the 5' terminal used for PCR amplification of the coding fragment of the human antibody heavy chain $\gamma 1$ constant or Fc region

<400> 26

agcaagcttt catttaccg gagacaggga 30

<210> 27

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of a 5'-primer incorporating the Sal I recognition site at the 5' terminal used for PCR amplification of the chicken β -actin promoter fragment lacking the intron

<400> 27

acgcgtcgac gtgcatgcac gctcattg 28

<210> 28

<211> 26

12/15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of a 3'-primer incorporating the Sal I recognition site at the 5' terminal used for PCR amplification of the chicken β -actin promoter fragment lacking the intron

<400> 28

acgcgtcgac aacgcagcga ctcccg 26

<210> 29

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of a 5'-primer incorporating the Sal I recognition site at the 5' terminal used for PCR amplification of the coding fragment of the antibody κ light chain

<400> 29

aatgtcgaca tgggtgtccac ttctcagctc 30

<210> 30

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of a 3'-primer incorporating the Sal I recognition site at the 5' terminal used for PCR amplification of the coding fragment of the antibody κ light chain

13/15

<400> 30

ttcgtcgacc taacactctc ccctgttgaa 30

<210> 31

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of a 5'-primer incorporating the Sal I recognition site at the 5' terminal used for PCR amplification of the IRES fragment

<400> 31

acgcgtcgac cgccccctctc cctccccc 28

<210> 32

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of a 3'-primer incorporating the Xho I recognition site at the 5' terminal used for PCR amplification of the IRES fragment

<400> 32

ccgctcgaga ttatcatcgt gtttttcaaa ggaaaaccac gtc 43

<210> 33

<211> 61

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

14/15

<223> Designed oligonucleotide acting as a sense chain in annealing to construct the coding fragment of the chicken lysozyme secretion signal

<400> 33

ctagaccatg aggtctttgc taatcttggt gctttgcttc ctgcccctgg ctgctctggg 60
g 61

<210> 34

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide acting as an anti-sense chain in annealing to construct the coding fragment of the chicken lysozyme secretion signal

<400> 34

ccccagagca gccaggggca ggaagcaaag caccaagatt agcaaagacc tcatggt 57

<210> 35

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of a 5'-primer incorporating the Dra I recognition site at the 5' terminal used for PCR amplification of the scFv coding fragment

<400> 35

gcgttttaaag tgacgttgga cgtccg 26

<210> 36

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of a 3'-primer incorporating the BamH I recognition site at the 5' terminal used for PCR amplification of the scFv coding fragment

<400> 36

attaggatcc gcgcttaagg acggtcagg 29

<210> 37

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed sequence of a 5'-primer incorporating the BamH I recognition site at the 5' terminal used for PCR amplification of the coding fragment of the human antibody heavy chain γ 1 Fc region

<400> 37

attaggatcc gagcccaaatt cttgtgacaa aactc 35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/10198

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ A01K67/027, C12N15/13, C12P21/02, C07K16/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ A01K67/027, C12N15/13, C12P21/02, C07K16/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI/BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/ A	Mizuarai, S. et al., Production of transgenic quails with high frequency of germ-line transmission using VSV-G pseudotyped retroviral vector., Biochem.Biophys.Res.Comm., Aug.2001, Vol.286, No.3, pages 456 to 463	41/1-24/ 25-40
X/Y/ A	WO 02/047475 A1 (KANEKA CORP.), 20 June, 2002 (20.06.02), & JP 2002-176880 A & AU 7769901 A	41/1-24/ 25-40
X/Y/ A	Harvey A.J. et al., Consistent production of transgenic chickens using replication-deficient retroviral vectors and high-throughput screening procedures., Poult.Sci., Feb.2002, Vol.81, No.2, pages 202 to 212	41/1-24/ 25-40

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* "A"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier document but published on or after the international filing date	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&"	document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search
02 October, 2003 (02.10.03)

Date of mailing of the international search report
14 October, 2003 (14.10.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

International application No.

PCT/JP03/10198

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y/ A	Ken'ichiro ONO et al., "Transgenic Uzura ni Okeru Sonyu Idenshi no Genome Kaiseki", The Society of Chemical Engineers, Japan Shuki Taikai Kenkyu Happyo Koen Yoshishu, 31 August, 2001 (31.08.01), Vol.34, page 415	41/1-24/ 25-40
Y	Powers D.B. et al., Expression of single-chain Fv-Fc fusions in Pichia pastoris., J.Immunol.Methods., May 2001, Vol.251, pages 123 to 135	1-24
Y/A	WO 97/03555 A1 (HOECHST PHARMACEUTICALS & CHEMICALS KABUSHIKI KAISHA), 06 February, 1997 (06.02.97), & JP 09-028235 A	6/36
A	EP 424044 A1 (MERCK & CO., INC.), 24 April, 1991 (24.04.91), Claim 5 & JP 03-210136 A & CA 2027619 A	25-40

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A01K67/027, C12N15/13, C12P21/02, C07K16/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A01K67/027, C12N15/13, C12P21/02, C07K16/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI/BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y/A	Mizuarai S, et al. Production of transgenic quails with high frequency of germ-line transmission using VSV-G pseudotyped retroviral vector. Biochem. Biophys. Res. Commun. Aug. 2001, Vol.286, No.3, p.456-463	41/1-24/25-40
X/Y/A	WO 02/047475 A1 (KANEKA CORPORATION) 2002.06.20 & JP 2002-176880 A & AU 7769901 A	41/1-24/25-40

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.10.03

国際調査報告の発送日

14.10.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

北村 弘樹



4B

9349

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X/Y/A	Harvey AJ, et al. Consistent production of transgenic chickens using replication-deficient retroviral vectors and high-throughput screening procedures. Poult. Sci. Feb. 2002, Vol.81, No.2, p.202-212	41/1-24/25-40
X/Y/A	小野健一郎他, トランスジェニックウズラにおける挿入遺伝子のゲノム解析, 化学工学会秋季大会研究発表講演要旨集 2001. 08. 31, 第34巻, 第415頁	41/1-24/25-40
Y	Powers DB, et al. Expression of single-chain Fv-Fc fusions in <i>Pichia pastoris</i> . J. Immunol. Methods. May 2001, Vol.251, p.123-135	1-24
Y/A	WO 97/03555 A1 (HOECHST PHARMACEUTICALS & CHEMICALS K. K.) 1997.02.06 & JP 09-028235 A	6/36
A	EP 424044 A1 (MERCK & CO. INC.) 1991.04.24 claim 5 & JP 03-210136 A & CA 2027619 A	25-40